



David Montes Liebermann

Licenciado em Engenharia Química e Bioquímica

Implementação e Otimização de Sistemas de Controlo do Reator de Acumulação para a Produção de PHA

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Química e Bioquímica

Orientador: Professor Doutor Mário Fernando José Eusébio,
Departamento de Química da Faculdade de Ciências
e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Co-orientador: Fernando Ramos Silva, Aluno de Doutoramento na
Faculdade de Ciências e Tecnologia da
Universidade Nova de Lisboa



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Março de 2018

Implementação e Otimização de Sistemas de Controlo do Reator de Acumulação para a Produção de PHA

Copyright © David Montes Liebermann, Faculdade de Ciências e Tecnologia - Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

A elaboração deste trabalho não teria sido possível sem a colaboração, estímulo e empenho de diversas pessoas. Gostaria, por este facto, de expressar toda a minha gratidão e apreço a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para que esta tarefa se tornasse realidade. A todos quero manifestar os meus sinceros agradecimentos.

Contudo gostaria de deixar três agradecimentos muito especiais:

- Ao orientador professor Mário Eusébio, por todo o apoio, incentivo e orientação prestada, não só na realização desta dissertação, mas também na maioria do meu percurso académico.
- Ao co-orientador Fernando Silva, pela sua disponibilidade, paciência e incentivo ao longo da elaboração dos trabalhos desta dissertação.
- À professora Maria Ascensão Reis por ter proporcionado a oportunidade de eu efetuar esta dissertação num grupo no qual fui bem recebido e onde obtive muitas e valiosas mais-valias para o futuro profissional e pessoal.

Resumo

Um dos principais problemas que afeta a sociedade na atualidade é a dependência da indústria petroquímica. Os polihidroxialcanoatos (PHA) são biopolímeros, totalmente biodegradáveis, provenientes da atividade metabólica de alguns microrganismos e, atualmente, apresentam-se como uma das alternativas para os plásticos provenientes do petróleo. No entanto, o elevado preço (2-6 €/kg) impede que estes sejam competitivos com outros biopolímeros e com os plásticos em geral. A utilização de culturas mistas e fontes de carbono derivadas de resíduos permitirá tornar este bioplástico competitivo para aplicações, nomeadamente no sector das embalagens e filmes.

Esta dissertação tem como objetivo a automação e implementação de estratégias de controlo para um reator de produção de polihidroxialcanoatos, à escala piloto, utilizando culturas mistas e ácidos gordos de cadeia curta como fonte de carbono, bem como avaliar o seu desempenho. Foram programados e testados dois algoritmos de controlo da alimentação de substrato baseados na monitorização do pH e do oxigénio dissolvido. Realizaram-se sete ensaios à escala laboratorial, num reator de 600 mL, e dez ensaios à escala piloto, num reator de 60 L.

Relativamente à automação o algoritmo baseado na monitorização do oxigénio dissolvido apresentou autonomia total, enquanto o algoritmo baseado na monitorização do pH obrigou à alteração de parâmetros de controlo durante o processo.

Observou-se uma média de produção de 253 gramas e uma % PHA média de 65% (gPHA/gTSS). Foi adicionada uma média de 449 gCQO de ácidos gordos de cadeia curta e concluiu-se que o algoritmo de monitorização do oxigénio dissolvido obteve melhores resultados em praticamente todos os parâmetros estudados, com destaque para a produtividade volumétrica média de 1,06 gPHA/L.h, para a % ácidos gordos de cadeia curta consumida de 94% e para o rendimento de conversão médio de 0,82 gCQO PHA/gCQO VFA. Concluiu-se ainda, que os resultados obtidos nesta dissertação estão em linha com os divulgados por outros autores, obtendo-se em certos casos valores superiores. Em relação às produtividades volumétricas médias observou-se uma média para os ensaios deste trabalho de 0,84 gPHA/L.h, ou seja, 2,5 vezes superior à média dos resultados retirados de trabalhos de outros autores utilizando MMC. Já o valor médio de % PHA de 65% obtido nesta dissertação foi 12% superior à média dos valores retirados do levantamento bibliográfico.

Palavras-chave: Ácidos gordos voláteis, automação, controlo de processos, culturas microbianas mistas, polihidroxialcanoatos, produção

Abstract

One of the main problems affecting society nowadays is dependence on the petrochemical industry. Polyhydroxyalkanoates are fully biodegradable biopolymers produced by the metabolic activity of some microorganisms and is currently one of the alternatives for plastics from petroleum. However, the high price (2-6 € / kg) prevents them from being competitive with other biopolymers and plastics in general. The use of mixed cultures and carbon sources derived from residues will make this bioplastic competitive for applications, particularly in the packaging and film sector.

This dissertation aims at the automation and implementation of control strategies for a pilot scale polyhydroxyalkanoates production reactor using mixed cultures and volatile fatty acids as a carbon source, as well as to evaluate its performance. Two substrate feeding control algorithms based on pH and dissolved oxygen monitoring were programmed and tested. Seven laboratory-scale assays were performed in a 600 mL reactor and ten pilot scale assays in a 60 L reactor.

Regarding the automation, the algorithm based on dissolved oxygen monitoring showed total autonomy, whereas the algorithm based on pH monitoring forced the change of control parameters during the process.

A production average of 253 gPHA and an average %PHA of 65% (gPHA / gTSS) was observed. A mean of 449 gCQO of volatile fatty acids was added and it was concluded that the DO monitoring algorithm obtained better results in practically all the studied parameters, with emphasis on the average volumetric productivity of 1.06 gPHA / Lh, for the % VFA consumed of 94% and for the average conversion yield of 0.82 gCQO PHA / gCQO VFA. It was also concluded that the results obtained in this dissertation are in line with those published by other authors, obtaining in certain cases higher values. In relation to the average volumetric productivity, a mean of 0.84 gPHA / L.h was observed in the present study, 2.5 times higher than the average of the results obtained from other authors using MMC. The average value of % PHA of 65% obtained in this dissertation was 12% higher than the mean values obtained from the bibliographic survey.

Keywords: Automation, mixed microbial cultures, polyhydroxyalkanoates, process control, production, volatile fatty acids

Índice

1	Enquadramento e Motivação.....	1
1.1	Objetivos.....	7
2	Introdução	9
2.1	PHA: Características, Aplicações e Produção	9
2.2	Produção de PHA através de Culturas Puras	10
2.3	Produção de PHA através de Culturas Mistas.....	13
2.4	Produção de PHA: Culturas Puras <i>versus</i> Culturas Mistas.....	16
2.5	Reator de Acumulação.....	17
2.6	Controlo da Alimentação ao Reator por Monitorização do pH	19
2.7	Controlo da Alimentação ao Reator por Monitorização do DO.....	21
2.8	Alimentação Contínua.....	23
3	Materiais e Métodos.....	25
3.1	Objetivos Comuns	25
3.2	Algoritmos de Controlo.....	25
3.2.1	1º Algoritmo: Controlo <i>On/Off</i> por <i>setpoint</i> de pH.....	25
3.2.2	2º Algoritmo: Controlo <i>On/Off</i> por <i>setpoint</i> de DO e declive.....	27
3.2.3	3º Algoritmo: Controlo <i>On/Off</i> através do Parâmetro δ	30
3.2.4	4º Algoritmo: Alimentação Contínua	31
3.3	Preparações e Protocolos Experimentais	32
3.4	Indicadores de Rentabilidade	36
3.5	LabVIEW	37
4	Discussão de Resultados	39
4.1	Ensaio Preliminares de Validação dos Algoritmos.....	39
4.1.1	1º Algoritmo: Controlo <i>On/Off</i> por <i>setpoint</i> de pH.....	39
4.1.2	2º Algoritmo: Controlo <i>On/Off</i> por <i>setpoint</i> de DO e declive.....	42
4.2	Ensaio de Produção à Escala Piloto.....	44
4.2.1	1º Algoritmo: Descrição dos Ensaio	45
4.2.2	1º Algoritmo: Resumo dos Resultados	74
4.2.3	2º Algoritmo: Descrição dos Ensaio	74
4.2.4	2º Algoritmo: Resumo dos Resultados	94
4.2.5	Comparações do Desempenho dos Ensaio Realizados	95
5	Conclusões e Trabalho Futuro.....	103
	Referências Bibliográficas	105

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Estrutura da procura de plásticos por região	1
Figura 1.2 - Capacidades instaladas e taxas de ocupação por região	2
Figura 1.3 - Comparação de parâmetros ambientais de alguns polímeros	3
Figura 1.4 - Capacidades instaladas dos biopolímeros por aplicação em 2014	4
Figura 1.5 - Capacidade instalada mundial dos biopolímeros	5
Figura 1.6 - Estrutura das capacidades instaladas por tipo de polímero	5
Figura 1.7 - Previsões de produção de petróleo e gás	6
Figura 2.1 - Monómero de PHB	9
Figura 2.2 - Estruturas Moleculares dos VFA	11
Figura 2.3 - Caminho metabólico para a produção de PHA	12
Figura 2.4 - Processo típico de produção de PHA através de MMC	14
Figura 2.5 - Cinética de Michaelis-Menten	19
Figura 2.6 - Comportamento esperado utilizando alimentação por pulsos controlada por pH	21
Figura 2.7 - Comportamento esperado utilizando alimentação por pulsos controlada por DO	22
Figura 2.8 - Ilustração dos valores usados para o cálculo do parâmetro δ	23
Figura 3.1 - Diagrama de fluxo do 1º Algoritmo	27
Figura 3.2 - Diagrama de fluxo do 2º algoritmo	29
Figura 3.3 - Diagrama de fluxo do 3º algoritmo	31
Figura 3.4 - Reator de escala laboratorial	32
Figura 3.5 - Reator de escala piloto	34
Figura 3.6 - Janela de monitorização do programa	38
Figura 3.7 - Janela de configuração dos parâmetros da sequência de controlo	38
Figura 4.1 - Tempo de consumo dos pulsos dos ensaios preliminares do 1º Algoritmo	41
Figura 4.2 - Tempo de consumo dos pulsos nos ensaios preliminares do 2º Algoritmo	43
Figura 4.3 - Progressão do parâmetro setpoint do declive	44
Figura 4.4 - Perfil de pH obtido no ensaio pH 1	46
Figura 4.5 - Tempo de consumo dos pulsos e quantidade de PHA por litro de reator do ensaio pH 1	48
Figura 4.6 - pH mínimo e pH que acionou a alimentação no ensaio pH 1	48
Figura 4.7 - Quantidade de VFA adicionada e consumida no ensaio pH 1	52
Figura 4.8 - Perfil de pH obtido no ensaio pH 2	53
Figura 4.9 - Tempo de consumo dos pulsos e quantidade de PHA por litro de reator do ensaio pH 2	54
Figura 4.10 - pH mínimo e pH que acionou a alimentação no ensaio pH 2	55
Figura 4.11 - Quantidade de VFA adicionada e consumida no ensaio pH 2	58
Figura 4.12 - Perfil de pH obtido no ensaio pH 3	59
Figura 4.13 - Tempo de consumo dos pulsos e quantidade de PHA por litro de reator do ensaio pH 3	60
Figura 4.14 - pH mínimo e pH que acionou a alimentação no ensaio pH 3	61
Figura 4.15 - Quantidade de VFA adicionada e consumida no ensaio pH 3	64
Figura 4.16 - Perfil de pH obtido no ensaio pH 4	64
Figura 4.17 - Tempo de consumo dos pulsos e quantidade de PHA por litro de reator do ensaio pH 4	65

Figura 4.18 - pH mínimo e pH que acionou a alimentação no ensaio pH 4	66
Figura 4.19 - Quantidade de VFA adicionada e consumida no ensaio pH 4.....	68
Figura 4.20 - Perfil de pH obtido no ensaio pH 5	69
Figura 4.21 - Tempo de consumo dos pulsos e quantidade de PHA por litro de reator do ensaio pH 5.....	70
Figura 4.22 - pH mínimo e pH que acionou a alimentação no ensaio pH 5	71
Figura 4.23 - Quantidade de VFA adicionada e consumida no ensaio pH 5.....	73
Figura 4.24 - Perfil de DO obtido no ensaio DO 1	75
Figura 4.25 - Tempo de consumo dos pulsos e quantidade de PHA por litro de reator do ensaio DO 1	76
Figura 4.26 - Valores de DO e declives dos pulsos do ensaio DO 1.....	77
Figura 4.27 - Quantidade de VFA adicionada e consumida no ensaio DO 1	79
Figura 4.28 - Perfil de DO obtido no ensaio DO 2	80
Figura 4.29 - Perfil de DO obtido no ensaio DO 3	81
Figura 4.30 - Tempo de consumo dos pulsos e quantidade de PHA por litro de reator do ensaio DO 3	82
Figura 4.31 - Valores de DO e declives dos pulsos do ensaio DO 3.....	82
Figura 4.32 - Quantidade de VFA adicionada e consumida no ensaio DO 3	84
Figura 4.33 - Perfil de DO obtido no ensaio DO 4	85
Figura 4.34 - Tempo de consumo dos pulsos e quantidade de PHA por litro de reator do ensaio DO 4	86
Figura 4.35 - Valores de DO e declives dos pulsos do ensaio DO 4.....	87
Figura 4.36 - Quantidade de VFA adicionada e consumida no ensaio DO 4	89
Figura 4.37 - Perfil de DO obtido no ensaio DO 5	90
Figura 4.38 - Tempo de consumo dos pulsos e quantidade de PHA por litro de reator do ensaio DO 5	91
Figura 4.39 - Valores de DO e declives dos pulsos do ensaio DO 5.....	91
Figura 4.40 - Quantidade de VFA adicionada e consumida no ensaio DO 5	94
Figura 4.41 - Resumo da quantidade de PHA produzida e tempo de acumulação de todos os ensaios.....	96
Figura 4.42 - Produtividades volumétricas médias dos ensaios realizados.....	97
Figura 4.43 - Resumo das quantidades de VFA alimentadas e % de consumo para todos os ensaios.....	99
Figura 4.44 - Resumo da quantidade de VFA necessária e não aproveitada por ano ..	100

Índice de Tabelas

Tabela 2.1 - Comparação das principais propriedades mecânicas.....	10
Tabela 2.2 - Resultados de produção através de culturas puras.....	13
Tabela 2.3 - Resultados de produção através de substrato sintético.....	15
Tabela 2.4 - Resultados de produção através de substratos provenientes de downstream	16
Tabela 2.5 - Características de operação de culturas puras e mistas.....	17
Tabela 2.6 - Produtividades volumétricas de ensaios de produção de PHA com controlo de alimentação baseado na monitorização do pH.....	20
Tabela 2.7 - Produtividades volumétricas de ensaios de produção de PHA com controlo de alimentação baseado na monitorização do DO.....	22
Tabela 3.1 - Composição típica do substrato utilizado	33
Tabela 4.1 - Resumo das condições de operação e dos parâmetros utilizados nos ensaios do 1º algoritmo.....	39
Tabela 4.2 - Resultados de validação do 1º algoritmo.....	39
Tabela 4.3 - Rácio pH inicial/pH setpoint	40
Tabela 4.4 - Média e Desvio Padrão dos parâmetros de regressão quadrática aplicada aos sinais de pH entre pulsos.....	42
Tabela 4.5 - Resumo das condições de operação e dos parâmetros utilizados nos ensaios do 2º algoritmo.....	42
Tabela 4.6 - Resultados de validação do 2º algoritmo.....	43
Tabela 4.7 - Resumo das condições de operação dos ensaios de produção.....	45
Tabela 4.8 - Resumo dos volumes e quantidades adicionadas de substrato	46
Tabela 4.9 - Parâmetros aplicados no programa na acumulação pH 1.....	47
Tabela 4.10 - Resumo da quantidade de PHA produzida no ensaio pH 1.....	49
Tabela 4.11 - Características do polímero produzido no ensaio pH 1.....	49
Tabela 4.12 - Produtividades volumétricas do ensaio pH 1.....	50
Tabela 4.13 - Produtividades Específicas do ensaio pH 1.....	51
Tabela 4.14 - Concentração do substrato utilizado e volumes adicionados no ensaio pH 1.....	51
Tabela 4.15 - Composição do substrato utilizado no ensaio pH 1.....	51
Tabela 4.16 - Velocidades de Consumo Médias dos VFA adicionados no ensaio pH 1	52
Tabela 4.17 - Parâmetros aplicados no programa na acumulação pH 2.....	54
Tabela 4.18 - Resumo da quantidade de PHA produzida no ensaio pH 2.....	56
Tabela 4.19 - Características do polímero produzido no ensaio pH 2.....	56
Tabela 4.20 - Produtividades volumétricas do ensaio pH 2.....	57
Tabela 4.21 - Produtividades específicas do ensaio pH 2.....	57
Tabela 4.22 - Concentração do substrato utilizado e volumes adicionados no ensaio pH 2.....	58
Tabela 4.23 - Composição do substrato utilizado no ensaio pH 2.....	58
Tabela 4.24 - Velocidades de Consumo Médias dos VFA adicionados no ensaio pH 2	59
Tabela 4.25 - Parâmetros aplicados no programa na acumulação pH 3.....	60
Tabela 4.26 - Resumo da quantidade de PHA produzida no ensaio pH 3.....	61
Tabela 4.27 - Características do polímero produzido no ensaio pH 3.....	62
Tabela 4.28 - Produtividades volumétricas do ensaio pH 3.....	62
Tabela 4.29 - Produtividades específicas do ensaio pH 3.....	63

Tabela 4.30 - Concentração do substrato utilizado e volumes adicionados no ensaio pH 3.....	63
Tabela 4.31 - Composição do substrato alimentado no ensaio pH 3	63
Tabela 4.32 - Velocidades de Consumo Médias dos VFA adicionados no ensaio pH 3	64
Tabela 4.33 - Parâmetros aplicados no programa na acumulação pH 4.....	65
Tabela 4.34 - Resumo da quantidade de PHA produzida no ensaio pH 4.....	66
Tabela 4.35 - Características do polímero produzido no ensaio pH 4.....	67
Tabela 4.36 - Produtividades volumétricas do ensaio pH 4.....	67
Tabela 4.37 - Produtividades específicas do ensaio pH 4	67
Tabela 4.38 - Concentração do substrato utilizado e volumes adicionados no ensaio pH 4.....	68
Tabela 4.39 - Composição do substrato utilizado no ensaio pH 4.....	68
Tabela 4.40 - Velocidades de consumo dos VFA alimentados no ensaio pH 4	69
Tabela 4.41 - Parâmetros aplicados no programa na acumulação pH 5.....	70
Tabela 4.42 - Resumo da quantidade de PHA produzida no ensaio pH 5.....	71
Tabela 4.43 - Características do polímero produzido no ensaio pH 5	71
Tabela 4.44 - Produtividades volumétricas do ensaio pH 5.....	72
Tabela 4.45 - Produtividades específicas do ensaio pH 5	72
Tabela 4.46 - Concentração do substrato utilizado e volumes adicionados no ensaio pH 5.....	73
Tabela 4.47 - Composição do substrato utilizado no ensaio pH 5.....	73
Tabela 4.48 - Velocidades de consumo dos VFA alimentados no ensaio pH 5	74
Tabela 4.49 - Resumo dos principais resultados dos ensaios de produção utilizando o 1º algoritmo	74
Tabela 4.50 - Resumo dos volumes e quantidades adicionadas de substrato	75
Tabela 4.51 - Parâmetros aplicados no programa na acumulação DO 1	76
Tabela 4.52 - Resumo da quantidade de PHA produzida no ensaio DO 1	77
Tabela 4.53 - Características do polímero produzido no ensaio DO 1.....	77
Tabela 4.54 - Produtividades volumétricas do ensaio DO 1	78
Tabela 4.55 - Produtividades específicas do ensaio DO 1.....	78
Tabela 4.56 - Concentração do substrato utilizado e volumes adicionados no ensaio DO 1.....	79
Tabela 4.57 - Composição do substrato alimentado no ensaio DO 1.....	79
Tabela 4.58 - Velocidades de consumo dos VFA alimentados no ensaio DO 1.....	80
Tabela 4.59 - Parâmetros aplicados no programa na acumulação DO 3	81
Tabela 4.60 - Resumo da quantidade de PHA produzida no ensaio DO 3	83
Tabela 4.61 - Características do polímero produzido no ensaio DO 3.....	83
Tabela 4.62 - Produtividades volumétricas do ensaio DO 3	83
Tabela 4.63 - Produtividades específicas do ensaio DO 3.....	84
Tabela 4.64 - Concentração do substrato utilizado e volumes adicionados no ensaio DO 3.....	84
Tabela 4.65 - Composição do substrato alimentado no ensaio DO 3.....	84
Tabela 4.66 - Velocidades de consumo dos VFA alimentados no ensaio DO 3.....	85
Tabela 4.67 - Parâmetros aplicados no programa na acumulação DO 4	85
Tabela 4.68 - Resumo da quantidade de PHA produzida no ensaio DO 4	87
Tabela 4.69 - Características do polímero produzido no ensaio DO 4.....	87
Tabela 4.70 - Produtividades volumétricas do ensaio DO 4	88

Tabela 4.71 - Produtividades específicas do ensaio DO 4.....	88
Tabela 4.72 - Concentração do substrato utilizado e volumes adicionados no ensaio DO 4.....	89
Tabela 4.73 - Composição do substrato alimentado no ensaio DO 4.....	89
Tabela 4.74 - Velocidades de consumo médias dos VFA adicionados no ensaio DO 4	89
Tabela 4.75 - Parâmetros aplicados no programa na acumulação DO 5	90
Tabela 4.76 - Resumo da quantidade de PHA produzida no ensaio DO 5	92
Tabela 4.77 - Características do polímero produzido no ensaio DO 5.....	92
Tabela 4.78 - Produtividades volumétricas do ensaio DO 5	92
Tabela 4.79 - Produtividades específicas do ensaio DO 5.....	93
Tabela 4.80 - Concentração do substrato utilizado e volumes adicionados no ensaio DO 5.....	93
Tabela 4.81 - Composição do substrato alimentado no ensaio DO 5.....	93
Tabela 4.82 - Velocidades de consumo médias dos VFA adicionados no ensaio DO 5	94
Tabela 4.83 - Resumo dos principais resultados dos ensaios de produção utilizando o 2º algoritmo	95
Tabela 4.84 - Resumo dos parâmetros de avaliação do desempenho dos ensaios realizados	101
Tabela 4.85 - Resumo das médias global e por tipo de controlo dos parâmetros de avaliação	102

Glossário

PHA – Polihidroxicanoatos;

PET - Politereftalato de Etileno;

PE – Polietileno;

PP – Polipropileno;

HDPE – Polietileno de Alta Densidade;

LLDPE – Polietileno de Baixa Densidade;

PLA – Ácido Polilático;

PHB – Polihidroxibutirato;

Bio-PET30 – Politereftalato de Etileno de Proveniência Biológica;

Bio-PE - Polietileno de Proveniência Biológica;

P(3HB) - Poli-3-hidroxibutirato

MMC – Cultura Mista de Microrganismos;

VFA – Ácidos Gordos Voláteis/ *Volatile Fatty Acids*;

TSS – Peso Total de Sólidos/*Total Suspended Solids*;

Coenzima A – CoA

HB – Hidroxibutirato;

HV – Hidroxivalerato;

SBR – *Sequencing Batch Reactor*;

DO – Oxigénio Dissolvido;

DO_i – Oxigénio Dissolvido Inicial;

DO_{min(i)} – Oxigénio Dissolvido Mínimo do pulso i;

T_{Contador} – Tempo de espera inicial;

T_{BombaLigada} – Tempo de Bomba Ligada;

T_{BombaDesligada} – Tempo de Bomba Desligada;

pH_{sp} – *Setpoint* de pH;

τ – Tempo Máximo de Acumulação;

N_{p, média} – Número de Pontos para o cálculo da Média;

D_{sp} – *Setpoint* de Declive;

DO_{sp} – *Setpoint* de DO;

N_{p, Declive} – Número de Pontos para o cálculo do Declive;

Q_s – Caudal de Substrato Alimentado;

VSS – Peso Seco de Célula/*Volatile Suspended Solids*;

CQO – Carência Química de Oxigénio

V_{final} – Volume Final;

$T_{acumulação}$ – Tempo Total de Acumulação;

V_n – Volume no Reator no Pulso n;

t_n – Tempo de Acumulação até ao Pulso n;

X_A – Quantidade de Biomassa Ativa;

V_{Pulso} – Volume de um Pulso;

V_{Purga} – Volume da Purga;

$V_{ciclo(SBR)}$ – Volume Alimentado num ciclo do SBR;

V_{SBR} – Volume do Reator SBR;

$T_{Calibração}$ – Tempo utilizado para a Calibração da Bomba

$V_{Calibração}$ – Volume utilizado para a Calibração da Bomba;

pH_i – pH inicial.

1 Enquadramento e Motivação

Este capítulo tem como objetivo enquadrar o mercado dos Polihidroxialcanoatos (PHA) na indústria de produção de polímeros, bem como perceber qual a importância e a dimensão atual de mercados baseados em alternativas aos polímeros convencionais, como o mercado dos Bioplásticos. No final serão apresentados os objetivos pretendidos com a realização desta dissertação.

Plásticos são materiais orgânicos que, normalmente, são produzidos através de compostos derivados da petroquímica e borrachas, como por exemplo o Etileno, o Propileno e o Butadieno. Devido às suas características versáteis, desde o século XX têm sido utilizados para um vasto leque de aplicações, nomeadamente nos sectores de embalagens, de construção e automóvel, onde se tem verificado a substituição do uso de matérias-primas naturais, como por exemplo, a madeira, os vidros ou a borracha natural¹.

Em 2016, a nível mundial, a indústria dos plásticos apresentava uma procura de cerca de 340 milhões de toneladas, sendo esperado um crescimento anual do consumo de 4.1%, estimando-se, então, que em 2025 este valor atinja cerca de 500 milhões de toneladas²⁻⁴

Segundo a Figura 1.1, que representa a estrutura da procura mundial por região nos anos de 2015 e 2025 (estimativa)²⁻⁴, a região da Ásia-Pacífico é a que mais influencia a procura a nível mundial com um consumo de 185 milhões de toneladas em 2015, representando uma quota de mercado de 54%, o que demonstra a hegemonia desta região no panorama industrial global. Seguem-se as regiões da Europa, com 18% (60 milhões de toneladas) e da América do Norte, com 12% (41 milhões de toneladas). Estas três regiões, representam 84% da procura mundial de plásticos.

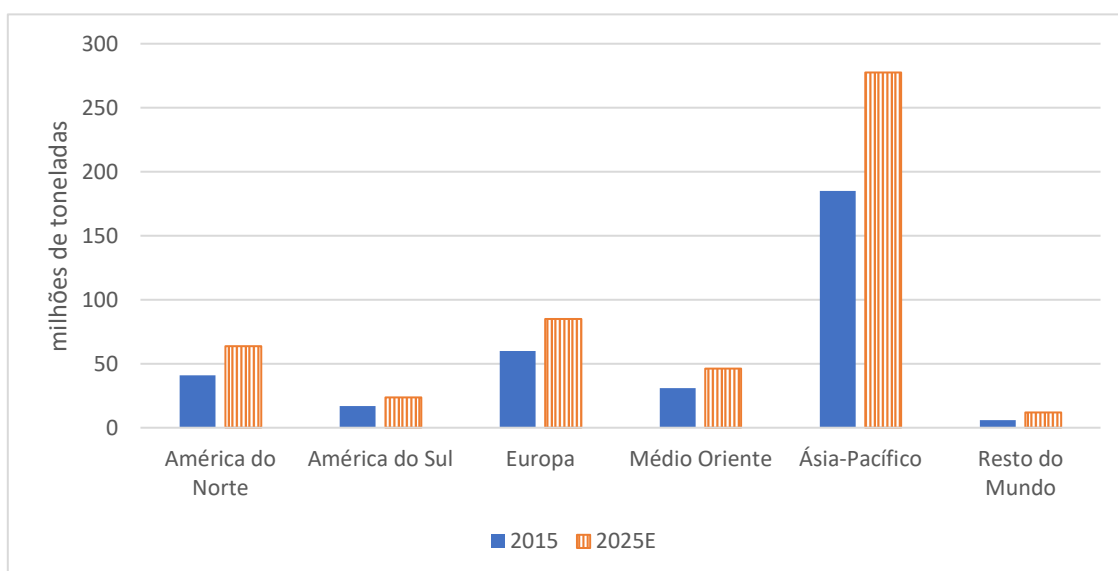


Figura 1.1 - Estrutura da procura de plásticos por região²⁻⁴

Em relação à capacidade instalada mundial para a produção de plásticos, em 2015, esta era de 455 milhões de toneladas, das quais 54% pertenciam à região da Ásia-Pacífico,

17% à Europa e 14% à América do Norte, como é visível na Figura 1.2^{4,5}. Ainda na mesma figura, podemos observar as taxas de ocupação por região, concluindo que a média mundial está situada nos 74%, valor muito próximo da média da indústria química⁴.

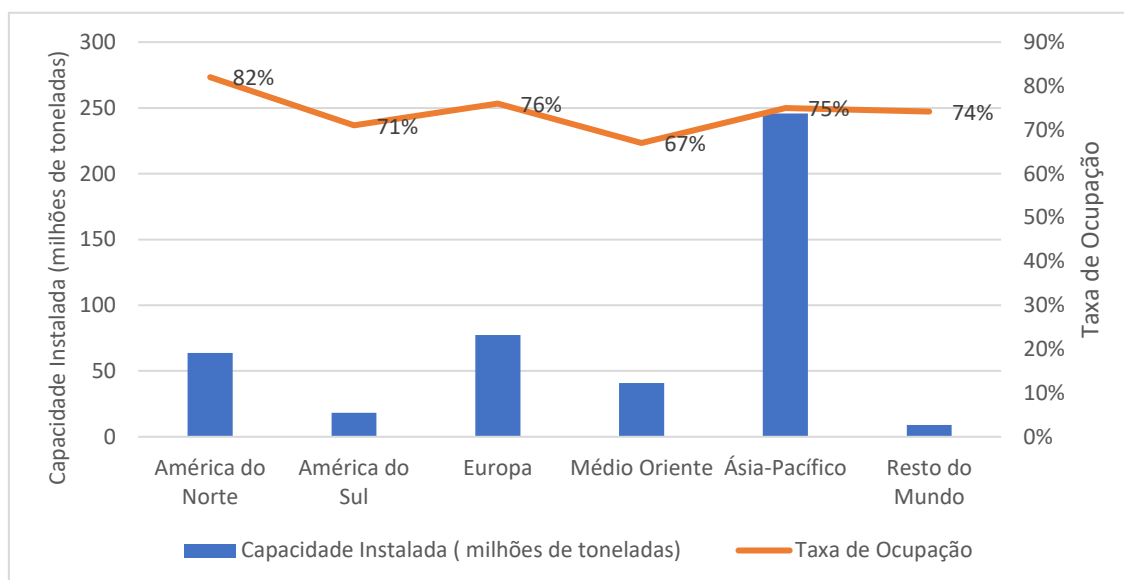


Figura 1.2 - Capacidades instaladas e taxas de ocupação por região^{4,5}

Com base nesta análise sucinta ao mercado mundial de plásticos podemos concluir que este é um mercado de grande dimensão, em que a região da Ásia-Pacífico se destaca tanto no consumo como na capacidade de produção.

Apesar das características que tornam a utilização de plásticos em larga escala apelativa, o uso sem critério deste material apresenta problemas de sustentabilidade, quer ao nível dos recursos, quer ao nível ambiental. A utilização predominante de matérias-primas de origem fóssil para a sua produção e o longo tempo de degradação, dependendo da aplicação, são fatores negativos que derivam da utilização dos plásticos, cujo consumo aumentará proporcionalmente com o aumento da população mundial e consequentemente a quantidade de plástico em estações de tratamento e oceanos também irá aumentar. Tendo presente que os plásticos podem demorar mais de 100 anos a ser decompostos na natureza, é essencial arranjar alternativas para a sua substituição no mercado. Neste contexto, o número de artigos e patentes focados em tentar encontrar essas alternativas têm vindo a aumentar^{6,7}.

Atualmente, os Biopolímeros, que são polímeros obtidos através de uma matéria-prima, ou processo derivado de atividade biológica, de que são exemplo as culturas microbianas, ou vegetais, representam uma das melhores alternativas para substituir os plásticos convencionais.

A Figura 1.3 representa uma comparação entre os polímeros convencionais e os biopolímeros a nível de avaliação ao impacto ambiental, onde é possível perceber que os polímeros mais consumidos mundialmente, como o politereftalato de etileno (PET), o polietileno (PE) e o polipropileno (PP), se encontram na zona dos materiais produzidos por compostos fósseis e que, ao mesmo tempo, não são biodegradáveis, enquanto biopolímeros, como os PHA e o ácido polilático (PLA), são provenientes de fontes

biológicas e totalmente biodegradáveis, o que para sectores como por exemplo o das embalagens e filmes apresenta vantagens ao nível da sustentabilidade ¹.

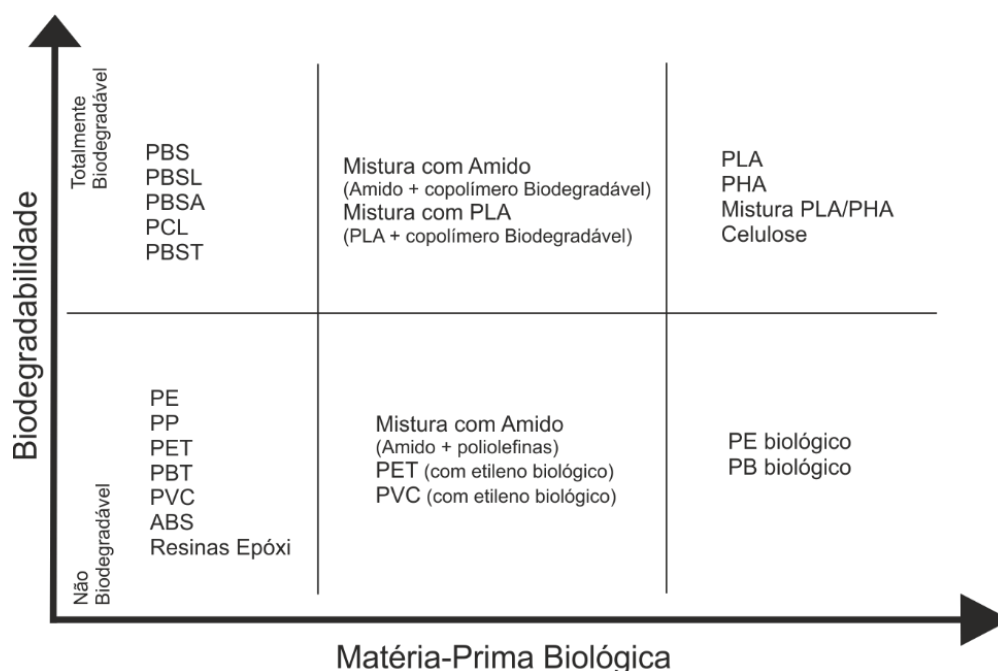


Figura 1.3 - Comparação de parâmetros ambientais de alguns polímeros ¹

Atualmente, devido aos elevados custos de produção muitos bioplásticos não são produzidos em quantidades suficientes para garantir a substituição dos polímeros convencionais. Ainda existe uma diferença significativa nos preços de ambos os tipos de polímero. Enquanto o PP, o polietileno de alta densidade (HDPE) e o polietileno de baixa densidade (LLDPE) têm preços na ordem dos 1-2 €/kg, os bioplásticos como o PLA (2-4 €/kg) e o polihidroxibutirato (PHB) (2-6 €/kg) ainda possuem preços de venda com valores na ordem do dobro, algo que parece ser uma barreira para a entrada em pleno dos biopolímeros nos mercados ^{8,9}.

A nível de mercado a capacidade instalada mundial tem vindo a aumentar a um ritmo elevado, de 2013 a 2016, a taxa média de crescimento da capacidade foi de 8%, subindo de 1.6 para 2.1 milhões de toneladas. ^{6,10}.

Consoante o tipo de aplicação, poderão existir vantagens ou desvantagens em que um polímero seja biodegradável. A Figura 1.4 demonstra as capacidades instaladas, em 2016, dos biopolímeros por aplicação. Na parte A da figura observa-se que a principal aplicação dos biopolímeros é a produção de embalagens. Já na parte B da mesma figura destaca-se que o biopolitereftalato de etileno (Bio-PET30) representa 75% do mercado para o setor das embalagens, fazendo com que este seja o principal biopolímero no mercado ^{6,7}.

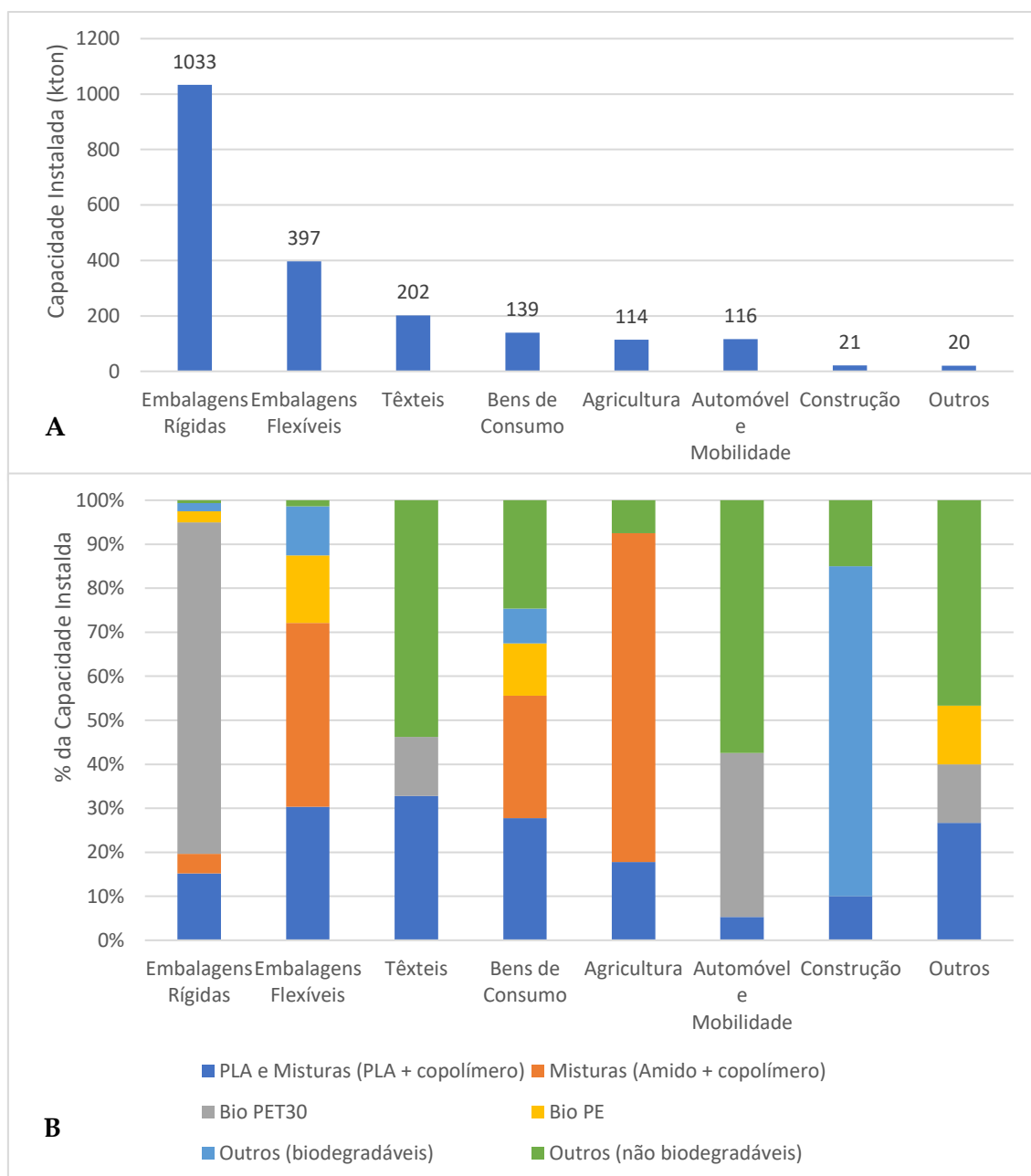


Figura 1.4 - Capacidades instaladas dos biopolímeros por aplicação em 2016^{6,7}

Dentro dos bioplásticos existem dois grupos distintos: os bioplásticos biodegradáveis e os bioplásticos não biodegradáveis. De ambos os grupos o mais representativo, e que apresenta maior taxa de crescimento, é o dos bioplásticos não biodegradáveis, como está representado na Figura 1.5. Assim, apesar da biodegradabilidade ser um fator essencial para a maioria dos plásticos, a principal vantagem dos bioplásticos será o fato de estes não dependerem do petróleo ou do gás para serem produzidos, eliminando a dependência existente no mercado atual.^{4,6,10}

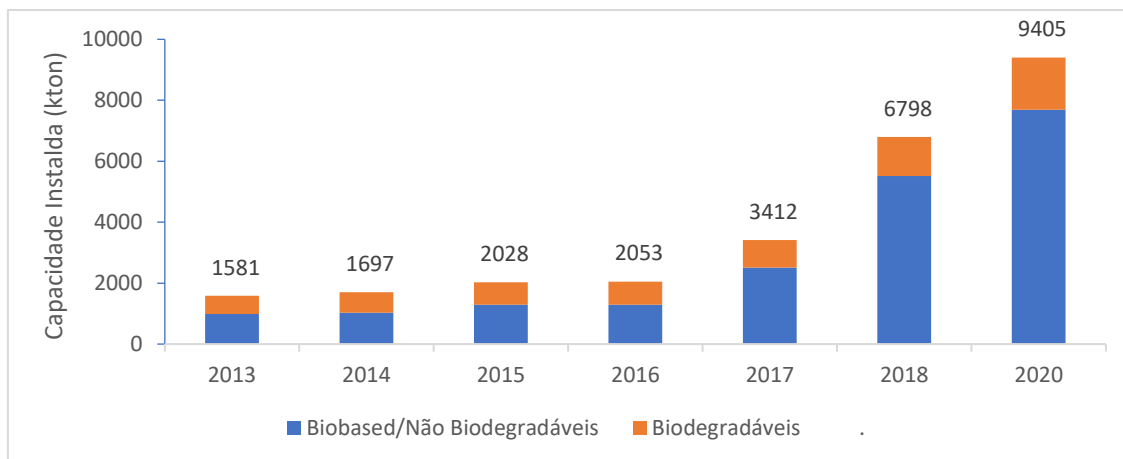


Figura 1.5 - Capacidade instalada mundial dos biopolímeros ^{6,7}

Em relação à distribuição das capacidades por tipo de polímero, representada na Figura 1.6, é possível concluir, novamente, que o biopolímero com maior mercado é o Bio-PET30 com 42% da capacidade mundial em 2016. Segundo uma projeção, em 2020, o Bio-PET30 irá representar 74% deste mercado, afirmando-se como o principal biopolímero. No entanto, os restantes também crescerão a taxas elevadas, como por exemplo, o PHA, que em 2015 representava 4% da capacidade mundial com cerca de 80 kton, apesar de perder terreno na estrutura de distribuição, em 2020 deverá constituir 2% da capacidade mundial, mas a capacidade projetada para esse ano é de 200 kton, o que equivale a uma taxa de crescimento da capacidade de 22% ^{6,7}.

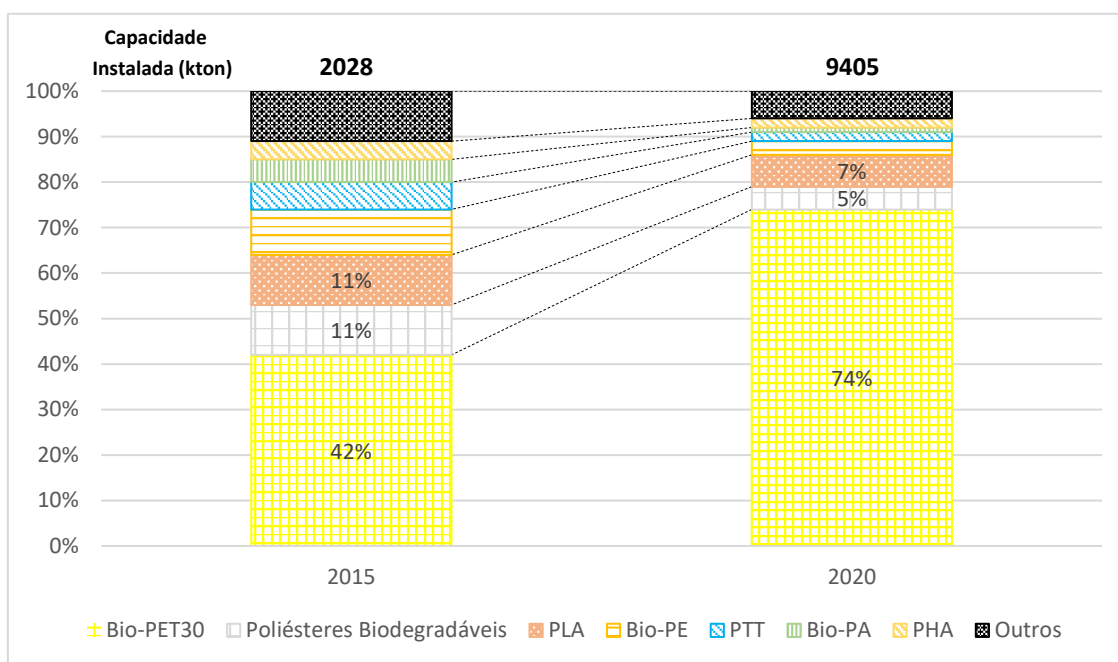


Figura 1.6 - Estrutura das capacidades instaladas por tipo de polímero ^{6,7}

Tendo em conta todas as informações anteriores é possível concluir, que não só a utilização de biopolímeros como substituto dos polímeros convencionais deverá aumentar substancialmente nos próximos anos, mas também que para os biopolímeros se tornarem mais competitivos será necessário baixar os custos de produção dos

mesmos. Para tal existem duas hipóteses, a primeira é aumentar os rendimentos das reações de produção dos biopolímeros, a segunda é se os preços das matérias-primas baixarem consideravelmente. Por exemplo, atualmente, para se produzir 1 tonelada de PHA, através de uma cultura pura, são necessárias 2,48 toneladas de glucose ^{6,11}. Sendo o preço da glucose 400 €/ton, o custo estimado em matérias-primas seria de 992 €/ton, valor muito superior ao custo dos polímeros provenientes do petróleo. Assim todos os estudos com o objetivo de otimizar o processo de produção dos biopolímeros tornam-se essenciais. No caso da produção de PHA a descoberta de um processo de produção através de culturas mistas (MMC) que utiliza substratos provenientes de resíduos aparenta ser uma fonte de redução dos custos de produção, como será abordado posteriormente.

De forma a explicitar, com maior relevo, a necessidade de alternativas à indústria petroquímica, nomeadamente aos polímeros, foi realizada uma breve análise às projeções futuras desse ramo da indústria química, que é responsável pela produção de inúmeros compostos utilizados no quotidiano de qualquer sociedade.

Em 2016 a produção de petróleo foi de cerca de 81 milhões de barris por dia, valor esse que tem aumentado desde a década de 80 ¹². Considerando as reservas e as tecnologias usadas para a extração de petróleo e, assumindo que a procura do mesmo continuará a aumentar nos próximos anos, as previsões para o futuro desta indústria não são otimistas. Em 2016 as reservas mundiais de petróleo comprovadas eram de cerca de 1 500 000 milhões de barris e com um consumo de 81 milhões de barris por dia, assumindo que o consumo é igual à produção, as reservas esgotar-se-ão em cerca de 50 anos ¹³. Na Figura 1.7 estão representadas as previsões para a produção de petróleo nos próximos anos.

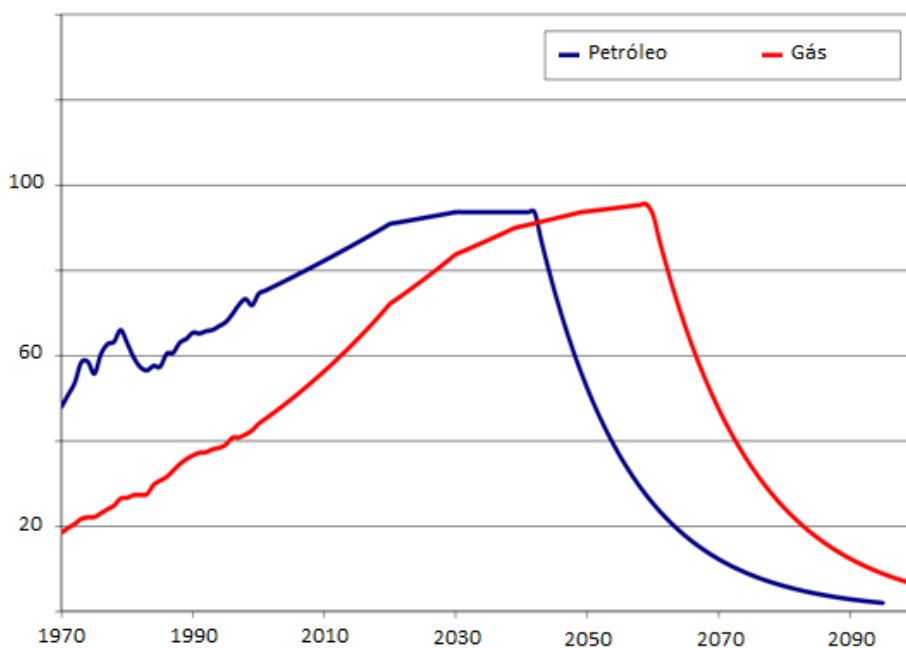


Figura 1.7 - Previsões de produção de petróleo e gás (adaptado de ^{13,14})

Tendo em conta este panorama, torna-se de extrema necessidade a substituição de matérias-primas e tecnologias relacionadas com as fontes fósseis. Neste âmbito, o

aumento, tanto na produção, como na investigação, de biopolímeros ganha uma grande importância.

1.1 Objetivos

Neste trabalho, o foco incidirá sobre a monitorização e controlo da última fase do processo de produção de PHA através da utilização de MMC e ácidos gordos de cadeia curta, ou *volatile fatty acids* (VFA) como fonte de carbono. O principal objetivo é o da automação do processo de acumulação de PHA e simultaneamente garantir uma boa produtividade. Para tal, serão apresentados e testados diferentes métodos de controlo relacionados, principalmente, com a forma de alimentação do substrato ao reator. Para por em prática e testar os diferentes métodos apresentados foi utilizado o software *LabVIEW* 2012.

2 Introdução

Neste capítulo vão ser abordadas as bases teóricas utilizadas para a realização desta dissertação, bem como serão apresentados alguns resultados obtidos em outros estudos considerados de relevância para o tema explorado.

2.1 PHA: Características, Aplicações e Produção

Os Polihidroxialcanoatos são biopolímeros produzidos e acumulados por algumas bactérias e servem como reservas de carbono e energia. Foram observados pela primeira vez ao microscópio em 1888 por Beijerinck, contudo a sua primeira caracterização, efetuada por Lemoigne, remonta a 1927¹⁵.

As características mais relevantes dos PHA são: a sua biodegradabilidade, biocompatibilidade, resistência à temperatura e à humidade, imiscibilidade em água e translucidez. É importante ter em conta que variações na composição e massa molecular do polímero final alteram as propriedades do mesmo.

O tipo de PHA mais comum é o poli-3-hidroxibutirato [P(3HB)], cujo monómero constituinte está representado na Figura 2.1, que apresenta excelentes propriedades termoplásticas. Tem um ponto de fusão de 173 a 180°C e o seu ponto de transição vítrea é 6.5°C. É um polímero altamente cristalino (55-80%) o que o torna rígido e quebradiço, limitando as suas aplicações. Apresenta uma flexibilidade de 2 a 10%, sendo este um valor muito baixo quando comparado com os polímeros concorrentes (ex. 400% do polipropileno).

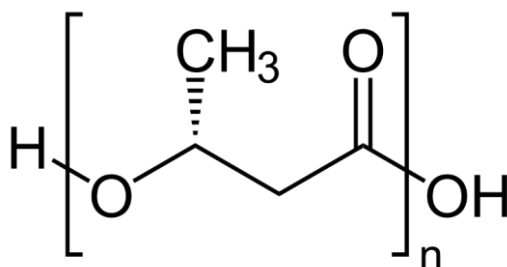


Figura 2.1 - Monómero de PHB¹⁶

Se os constituintes do polímero produzido forem monómeros de cadeia curta, tirando o P(3HB), a sua cristalinidade será baixa, melhorando assim as suas propriedades mecânicas. As temperaturas de fusão e de transição vítrea são baixas, quando comparadas com outros polímeros, o que permite que o polímero seja tratado a temperaturas mais baixas, reduzindo os custos de operação e evitando perdas de massa^{1,17}.

Tendo em conta a versatilidade dos diferentes tipos de PHA, cujas composições afetam as propriedades dos mesmos, estes podem ser utilizados num vasto leque de aplicações, destacando-se como principais: embalagens, sacos, filmes, objetos descartáveis e, em menor escala, aplicações biomédicas.

Na Tabela 2.1 observa-se que, em relação aos polímeros concorrentes para as aplicações do PHA, estes podem possuir características muito semelhantes adicionando o fato de serem biodegradáveis.

Tabela 2.1 - Comparação das principais propriedades mecânicas ⁹

Polímero	P(3HB)	P(3HB-co-3HV)			PP	HDPE	LDPE	PE	PET
% copolímero	-	9 %mol 3HV	14 %mol 3HV	20 %mol 3HV	-	-	-	-	-
Módulo de Young (Gpa)	3.5-4	1.9	1.5	1.2	1-1.7	0.4-1	0.05-0.1	3-3.1	2.2
Resistência à Tração (MPa)	40	37	35	32	29-39	18-33	15-79	50	56
Elongação %	5.5	-	-	-	500-900	12-700	150-600	3.5	7300
T de Fusão (°C)	173-180	162	150	145	170-176	112-132	88-130	80-110	262
T de Transição Vítrea (°C)	6.5	-	-	-1	-10	-80	-36	21	-

O PHA é acumulado pelas bactérias no meio intracelular e aparece sob a forma de grânulos com um diâmetro entre 0.2 e 0.8 μm . Após a obtenção de uma cultura com elevada capacidade de armazenamento de PHA, esta é colocada num reator de produção normalmente em condições de limitação de um ou mais nutrientes essenciais para o crescimento, de forma a evitar que este ocorra nesta fase, e na presença abundante de substrato ^{1,17}.

Diferentes fatores, como o tipo de substrato ou a seleção da cultura, podem afetar o processo de produção de PHA por parte de culturas de bactérias. Manter a produtividade, tendo em conta a variabilidade existente, torna este processo altamente complexo e de difícil controlo. Alguns destes fatores serão abordados posteriormente.

2.2 Produção de PHA através de Culturas Puras

Culturas puras podem ser definidas como culturas de microrganismos compostas apenas por uma espécie específica, no caso de produção de PHA são maioritariamente bactérias ¹⁸⁻²⁰.

Neste tipo de produção, as culturas puras podem ser separadas em dois grupos distintos:

- Culturas sem crescimento associado;
- Culturas com crescimento associado.

As culturas pertencentes ao primeiro grupo necessitam de limitação de nutrientes de forma a poderem acumular PHA. Neste caso, o crescimento e a produção de PHA ocorrem em duas fases diferentes. Na primeira fase, são alimentados os nutrientes

necessários e ocorre, preferencialmente, crescimento de biomassa até ao nível desejado. Na segunda fase, submete-se a cultura a um meio com limitação de um ou mais nutrientes essenciais para o crescimento, de forma a priorizar a produção e o armazenamento de PHA ^{17,21}.

As culturas com crescimento associado não necessitam de limitação de nutrientes sendo assim possível que a fase de crescimento e de produção ocorram simultaneamente num passo apenas. Ainda assim, de forma a otimizar a produtividade do processo, podem ocorrer períodos com limitação de nutrientes, tornando o controlo e a estratégia da alimentação dos mesmos extremamente importante para a obtenção de um bom rendimento. As culturas utilizadas nesta metodologia são geneticamente modificadas de forma a viabilizar o processo ^{22,23}.

Na literatura já foram relatados valores de conteúdo de PHA até 80-90% do peso celular seco cujas unidades são g PHA por g de *Total Suspended Solids* (TSS) ²².

Substratos Utilizados para a Produção de PHA

É importante ter em conta que existem diversos produtos que podem entrar no metabolismo dos microrganismos e dar origem a PHA, como por exemplo, álcoois (etanol, butanol, butano-2,3-diol) ou ainda ácidos (ácido acético, ácido butírico, ácido iso-butírico, ácido iso-valérico, ácido caproico), contudo dar-se-á maior importância aos produtos de fermentação utilizados nos ensaios desta dissertação.

Na Figura 2.2 estão representadas as estruturas moleculares de alguns produtos de fermentação utilizados para a produção de PHA e é possível observar que estes partilham estruturas maioritariamente idênticas mudando apenas o número de carbonos, com a exceção do ácido láctico que possui também mais um oxigénio.

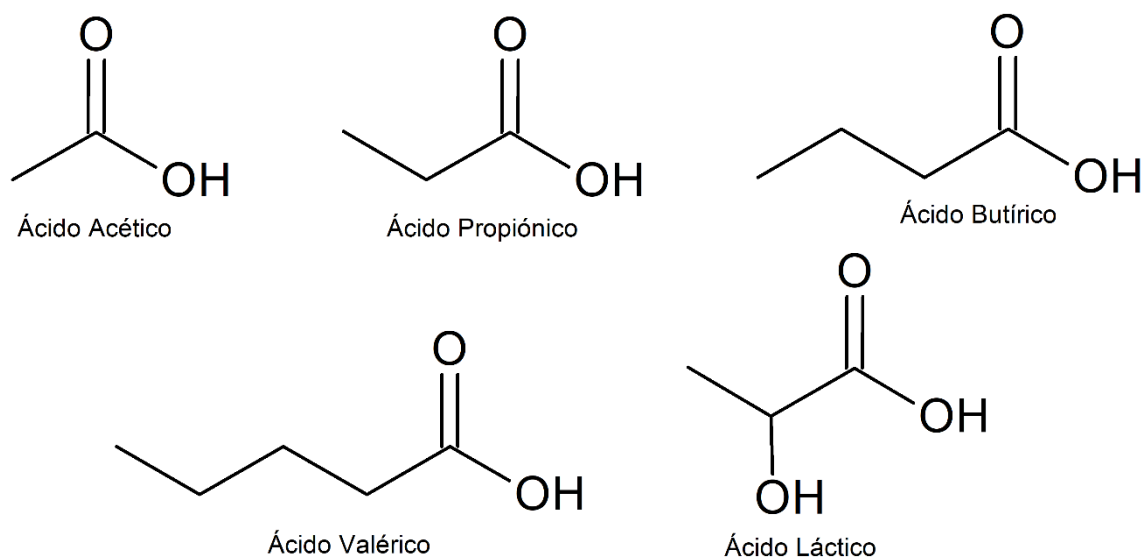


Figura 2.2 - Estruturas Moleculares dos VFA

De forma a ser possível compreender o método como as culturas transformam os produtos de fermentação, neste caso os ácidos gordos de cadeia curta, normalmente denominados de VFA, em PHA apresenta-se a Figura 2.3, onde está representado um

dos possíveis caminhos metabólicos para que este processo ocorra no interior das células. No caso do acetato e do propionato o processo de transformação ocorre em 4 passos. O 1º é a ativação da molécula por intermédio da coenzima A (CoA), o 2º é um passo de condensação onde se ligam 2 moléculas ativadas no passo anterior e se dá a libertação de uma molécula de água, o 3º passo consiste na redução da molécula obtida no 2º passo por intermédio de uma molécula de NADH, obtendo-se um monómero de hidroxibutirato (HB), no caso do acetato, e um monómero de hidroxibutirato (HV), no caso do propionato. O 4º e último passo é onde se dá a polimerização com a reação de diferentes monómeros ^{17,24,25}.

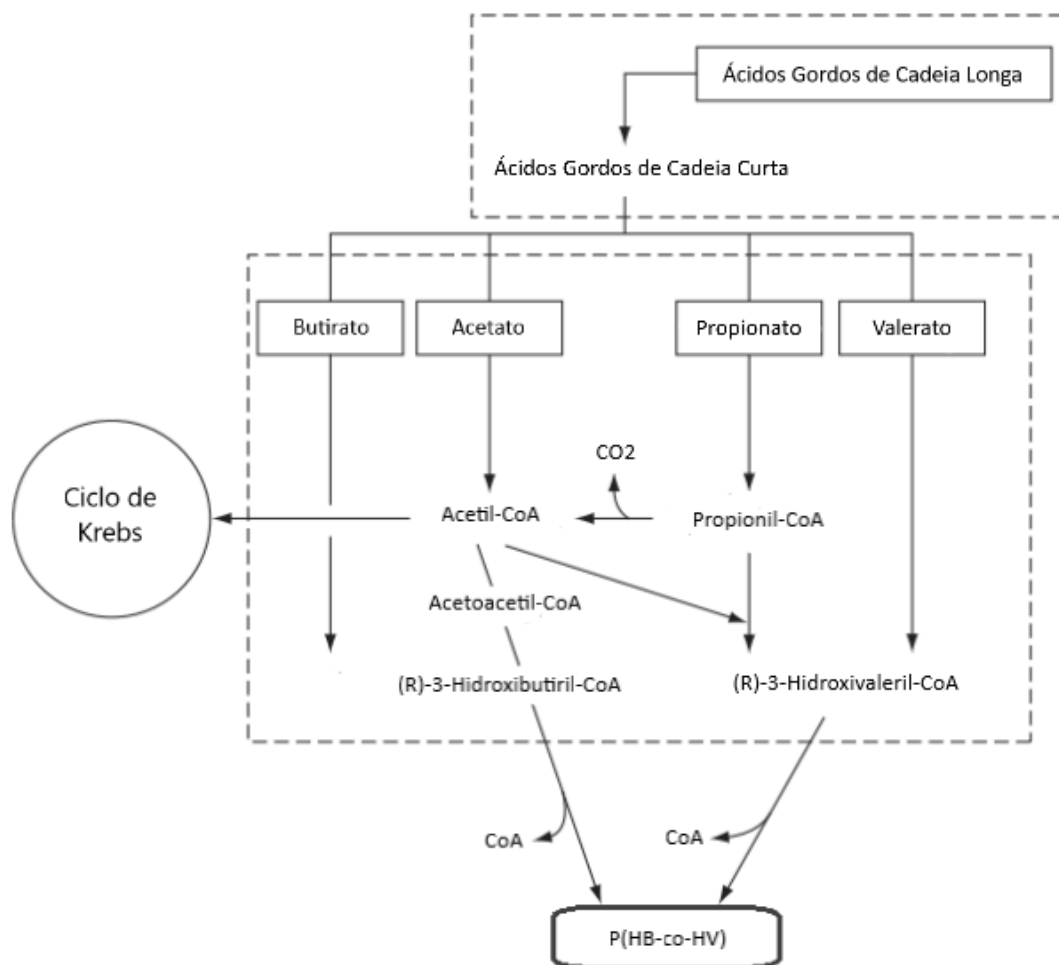


Figura 2.3 - Caminho metabólico para a produção de PHA (adaptado de ^{17,24})

A Tabela 2.2 apresenta valores de produtividade volumétrica obtidos em ensaios utilizando culturas puras. É importante ter em conta que os substratos usados não foram os mesmos e que o tipo de processo também difere. Ainda assim os valores obtidos não diferem substancialmente.

Tabela 2.2 - Resultados de produção através de culturas puras

Organismo	Substrato	Tipo de Processo	Concentração Celular (g/L)	Produtividade (gPHA/L.h)	Fontes
R.eutropha	Resíduos de Batata	Fed-Batch	179	1,47	26
A.eutrophus	Glucose	Fed-Batch	164	2,42	27
C.necator	Glucose	Crescimento: Batch Produção: Contínua	81	1,85	28
B.megaterium	Melaços de Cana de Açúcar	Fed-Batch	72,6	1,27	29

Para terminar é importante referir que, de forma a manter um processo com culturas puras é de extrema importância garantir que não existem contaminações na zona de produção. Manter um ambiente industrial esterilizado é algo que encarece os custos de produção. Assim, este tipo de produção acontece maioritariamente em instalações de pequenas dimensões e com aplicações de nicho de mercado, como aplicações no ramo biomédico.

2.3 Produção de PHA através de Culturas Mistas

Como já foi referido anteriormente, o elevado preço do processo de produção do PHA demonstra constituir uma das principais barreiras para a sua comercialização em larga escala. Nos últimos anos o principal foco de desenvolvimento e investigação tem recaído sobre formas de reduzir os custos inerentes ao processo de produção ^{17,30-34}. Atualmente o processo utilizando MMC aparenta ser económica e ambientalmente mais viável, direcionando-se para aí o principal foco dos estudos nos últimos anos ⁹.

As MMC são constituídas por diversos microrganismos que se desenvolvem, em comunidade, utilizando o mesmo substrato. Assim, existem diferentes microrganismos, com metabolismos distintos, a competir pelo substrato disponível, o que representa uma maior complexidade do que as culturas puras ⁹.

Atualmente, o processo mais comum utilizando MMC compreende três passos distintos, conforme representa a Figura 2.4:

- Fermentação da matéria-prima de forma a obter um substrato rico em VFA;
- Seleção da cultura num reator do tipo *sequencing batch reactor* (SBR), com o objetivo de obter uma cultura com grande potencial de produção de PHA;
- Produção de PHA, através de um reator *Batch/Fed-batch*, onde a cultura previamente selecionada é submetida a condições que vão favorecer apenas a acumulação de PHA.

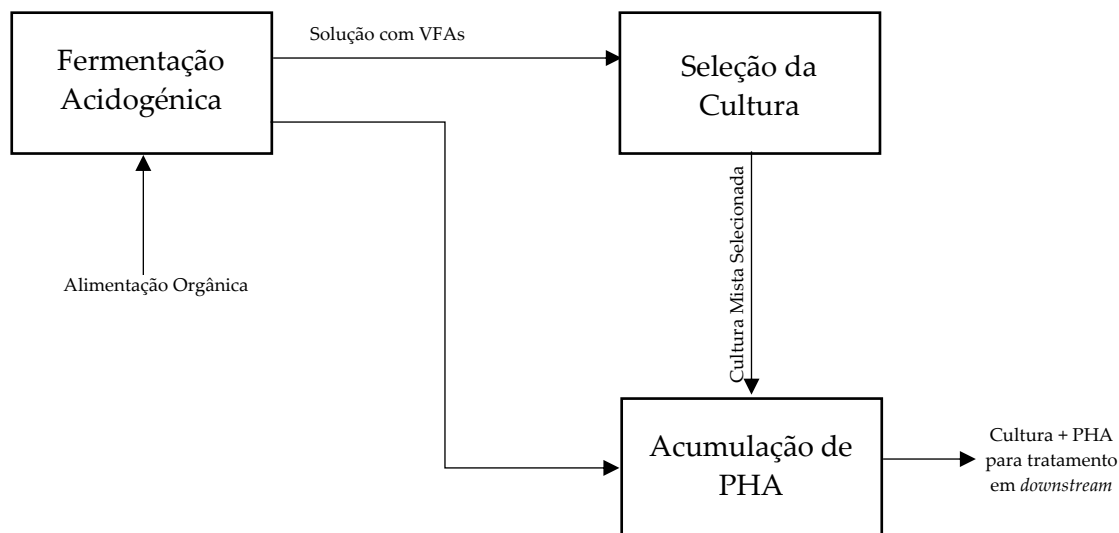


Figura 2.4 - Processo típico de produção de PHA através de MMC^{9,35}

Fase de Fermentação

O primeiro passo do processo ocorre, normalmente, num reator contínuo anaeróbio que transforma a fonte de carbono original proveniente da matéria-prima desejada, numa mistura de ácidos voláteis através de um processo de fermentação. Note-se que este passo só é necessário se o substrato original não for composto por produtos que podem ser utilizados pela cultura para a produção de PHA, como por exemplo efluentes industriais^{11,25,36}.

Fase de Seleção

O segundo passo do processo, a fase de seleção, ocorre aplicando uma pressão seletiva com o objetivo de se obter uma cultura com uma grande capacidade de produção de PHA. Com esse objetivo submete-se a cultura a 2 períodos distintos: o primeiro ocorre quando o sistema se encontra com excesso de fonte de carbono externa (fase de “*feast*”), nesse período a cultura terá tendência produzir o máximo de PHA, de forma a criar reservas de energia que permitem a sua sobrevivência, quando essa fonte se esgota ocorre o segundo período (fase de “*famine*”), onde os microrganismos pretendidos podem usar o PHA armazenado contra a falta de substrato. Assim, após a fase de *famine*, forçando longos períodos de *famine*, obtemos uma cultura com as especificações ideais para a fase de acumulação^{17,31,37}.

O reator utilizado nesta fase é inicialmente inoculado com lamas provenientes de uma ETAR e, para além de substrato rico em carbono, é também adicionada uma solução de N/P (Azoto e Fósforo) de forma a que seja possível existir crescimento da cultura. São ainda adicionados alguns micronutrientes, como por exemplo ferro, que auxiliam na manutenção de uma cultura estável^{24,30,32,38}.

Na Tabela 2.3 e na Tabela 2.4 estão representados alguns resultados retirados de bibliografia que ajudam a perceber em que ponto se encontra o processo de produção de PHA por MMC. Na primeira encontram-se resultados de ensaios de produção utilizando substrato sintético, enquanto na segunda o substrato utilizado é proveniente do *downstream* de processos industriais ou de tratamento de águas.

É perceptível que existe uma elevada dispersão nos valores dos parâmetros de avaliação de desempenho apresentados, demonstrando que tanto a seleção da cultura, como a fonte de carbono, como a estratégia de alimentação pode afetar diretamente o resultado de uma acumulação, algo que prova que este processo demonstra uma elevada variabilidade.

Tabela 2.3 - Resultados de produção através de substrato sintético

Fonte de Carbono	Estratégia de Alimentação	% PHA	Rendimento de Armazenamento, Y p/s (CQO/CQO)	Taxa de Armazenamento qP (gCQO/gCQO.h)	Produtividade Volumétrica (gPHA/L.h)	Fontes
VFA	Batch	-	0,62 (CmmolPHA/CmmolVFA)	0,37 (Cmmol/Cmmol.h)	0,86	36
VFA e Lactato	Batch	-	0,05-0,45	0,02-0,65	0,01-0,25	39
Acetato	Batch	69-80%	-	-	0,11-0,20	40
VFA	Batch	23-34%	0,16-0,32	-	0,07-0,12	41
VFA	Batch	24-38%	0,27-0,32	-	-	42
Acetato	Batch	38-43%	0,51-0,69	0,24-0,34	0,43-0,61	43
VFA	Batch	14-51%	0,06-0,53	0,034-0,216	0,01-0,07	44
VFA e Lactato	Batch	-	0,04-0,55	0,02-0,6	0,03-0,28	39
VFA	Fed-batch (multi-spike)	52%	0,62	0,32 (Cmmol/Cmmol.h)	0,46	45
VFA	Fed-batch (feed on demand)	17-39%	0,25-0,27	-	0,02-0,06	46
VFA	Fed-batch (feed on demand)	13-29%	0,18-0,44 (CmmolPHA/CmmolVFA)	0,04-0,15 (Cmmol/Cmmol.h)	3-10 (CmolPHA/L.h)	47
Acetato	Fed-batch (feed on demand)	15-79%	0,1-0,53	0,14-0,31	0,52	48

Tabela 2.4 - Resultados de produção através de substratos provenientes de downstream

Fonte de Carbono	Estratégia de Alimentação	% PHA	Rendimento de Armazenamento, Y p/s (CQO/CQO)	Taxa de Armazenamento qP (gCQO/gCQO.h)	Produtividade Volumétrica (gPHA/L.h)	Fontes
Produção de Azeite	Batch	80%	0,35	0,16	-	49
Produção de Papel	Batch	43-48%	0,33-0,67	0,046-0,056 (Cmmol/Cmmol.h)	0,09-0,13	50
Cana-de-açúcar	Batch	-	0,44-0,62 (CmmolPHA/CmmolVFA)	0,12-0,28 (Cmmol/Cmmol.h)	0,42-0,96	36
Cana-de-açúcar	Batch	33-61%	0,66-0,84 (CmmolPHA/CmmolVFA)	0,13-0,3 (Cmmol/Cmmol.h)	0,13-0,46	25
Lamas Secundárias	Batch	57%	-	0,31	0,31	51
Melaços	Fed-batch (multi-spike)	56%	0,85	0,17 (Cmmol/Cmmol.h)	0,37	45
Produção de Queijo	Fed-batch (multi-spike)	65%	0,67	0,3 (Cmmol/Cmmol.h)	0,56	52

2.4 Produção de PHA: Culturas Puras versus Culturas Mistas

Neste subcapítulo será efetuada uma resumida comparação entre o processo de produção através de culturas puras e mistas, de forma a explicitar a importância da otimização do processo MMC para a possível industrialização do PHA.

A nível de produtividade volumétrica, utilizando culturas puras, são relatados resultados superiores do que utilizando MMC. Comparando a Tabela 2.2 com as Tabelas 2.3 e 2.4 observa-se que as produtividades volumétricas relatadas utilizando MMC são cerca de 5 vezes superiores às utilizando culturas puras. Contudo é necessário ter em conta que o substrato utilizado pelas culturas puras é, normalmente, composto por apenas um único constituinte, por exemplo glucose, e que muitas vezes é obtido de forma sintética.

A glucose pode ser obtida através da fermentação de alguns produtos alimentares e são necessárias grandes quantidades de matéria-prima para tal. Este facto representa um problema tanto económico como ético, pois, a aplicação deste processo em larga escala poderá representar um grande consumo de produtos alimentares para a produção de polímeros, levantando a questão da utilização de produtos alimentares para algo que não o seu propósito comum, e colocando a indústria do PHA em competição com outras indústrias de dimensão muito superior ⁵³.

No caso das MMC, o substrato, para além de poder ser mais complexo, ou seja, composto por uma mistura de diferentes ácidos com potencial de produção de PHA, pode ser obtido através de resíduos urbanos ou industriais. Então, para além de se produzir um polímero que, em comparação com os seus concorrentes, é mais “verde”, também se

efetua valorização de resíduos. De forma a reduzir os elevados custos de transporte da matéria-prima até ao local de produção do polímero, existe a hipótese de se integrar a unidade de produção de PHA numa unidade industrial de tratamento de resíduos, como estações de tratamento de águas, assim, a obtenção das matérias-primas seria proveniente da própria instalação fabril e não de uma fonte externa ⁹.

Outro fator de alta relevância, quando é feita uma comparação entre culturas puras e mistas, é o fato de que o processo de produção por culturas puras tem de ser efetuado sob condições estéreis, algo que eleva o custo final do PHA. No caso das MMC não é necessário um ambiente esterilizado, diminuindo os custos da operação consideravelmente.

A Tabela 2.5 representa um resumo das principais diferenças entre os dois processos.

Tabela 2.5 - Características de operação de culturas puras e mistas ⁵⁴

Tipo de Cultura	Culturas Puras	Culturas Mistas
Condições	Limitação de nutrientes externa	Limitação de nutrientes interna
	Fonte de carbono em excesso	Processo Aeróbio, Anaeróbio ou Dinâmico
Substrato	Substrato único	Matérias residuais
Crescimento	Separadamente	Pode ocorrer simultaneamente
Meio	Meio sintético	Meio complexo
Configuração do Reator	(Fed)-batch	SBR
Vantagens	Produtividade volumétrica elevada	Substrato barato Baixos custos com O ₂
Desvantagens	Substrato caro Elevados custos com O ₂	Produtividade volumétrica baixa

2.5 Reator de Acumulação

Como já foi referido, atualmente, um dos principais problemas do processo de produção de PHA é o elevado custo de produção quando comparado ao dos produtos concorrentes, assim o controlo associado aos diferentes passos dessa produção é

essencial ⁵⁴. A otimização dos parâmetros e condições de operação, com o objetivo de aumentar a sua produtividade, é, certamente, uma das chaves para a industrialização do mesmo.

Nesta fase do processo o objetivo é a produção de PHA, para tal utiliza-se uma cultura previamente selecionada com microrganismos com elevada capacidade de produção e criam-se as condições necessárias para a produção em excesso do polímero pretendido.

O objetivo deste capítulo é estudar a variabilidade e forma da alimentação do substrato ao longo da fase de acumulação e compreender os métodos de controlo que se encontram diretamente relacionados com os dois fatores anteriores. Trabalhos anteriores avaliaram o comportamento do processo fazendo variar a composição da alimentação. Foi possível, então, compreender que existe consumo preferencial de alguns VFA, mas que, no entanto, a composição dos polímeros obtidos no final não seria significativamente afetada ^{17,31,37}. Já foram estudadas, também, diferentes formas de fazer a alimentação ao reator de acumulação: (1) alimentação do substrato apenas no início da fase de acumulação ^{25,36,39-44,49-51}; (2) alimentação por pulsos ^{17,30,37,38,45-48,52}; (3) alimentação contínua ³¹.

Em relação à forma de alimentação (1) já foi comprovado que pode levar a uma inibição da cultura por excesso de substrato, reduzindo, portanto, a velocidade de consumo do mesmo e consequentemente a produtividade do processo.

A alimentação por pulsos (2) é a forma de alimentação mais utilizada nos estudos sobre a produção de PHA e consiste num faseamento dos pulsos de alimentação do substrato controlado por monitorização *online* de um ou mais parâmetros, como por exemplo o valor de pH ou quantidade de oxigénio dissolvido (DO). Este controlo permite que, autonomamente e por intermédio de um software, o sistema estime o momento ótimo de introdução dos pulsos de substrato.

A forma de alimentação contínua (3) é a mais recente das documentadas apresentando pouca literatura disponível. Ainda assim os resultados disponíveis demonstram potencial quando comparados com os dos outros métodos. Neste caso, o PH do meio é mantido constante ao longo da fase de acumulação e o substrato é alimentado continuamente a uma velocidade predefinida.

É importante ter em conta que a monitorização dos valores utilizados para o controlo, como o pH ou o DO, é feita por intermédio de uma sonda e que o sinal registado pela mesma está sujeito a interferências externas que se manifestam sobre a forma de ruído. Assim, é essencial a aplicação de métodos matemáticos que ajudem a obtenção de valores o mais fiáveis possível, como um filtro de sinal.

Outro fator importante a ter em conta durante uma acumulação é o fato de que à medida que o polímero vai sendo produzido e armazenado pela cultura, as velocidades de consumo de substrato e de produção de PHA irão diminuir, maioritariamente devido a inibição por produto. Quanto maior for o conteúdo de PHA já acumulado, menor é a necessidade da cultura para continuar esse processo, o que conjuntamente com a aquisição e tratamento de dados *online* poderá servir para a obtenção de informações que podem ser úteis para a automação e otimização do processo em si.

A concentração de substrato presente no meio ao longo do tempo de acumulação, também deve ser tomada em conta, como se pode observar na Figura 2.5. Se a concentração for muito baixa a velocidade de consumo de substrato nunca irá atingir o valor máximo, enquanto que se a concentração de substrato for demasiado alta poderá existir inibição por substrato. Este facto demonstra a importância do controlo da alimentação de substrato ao reator.

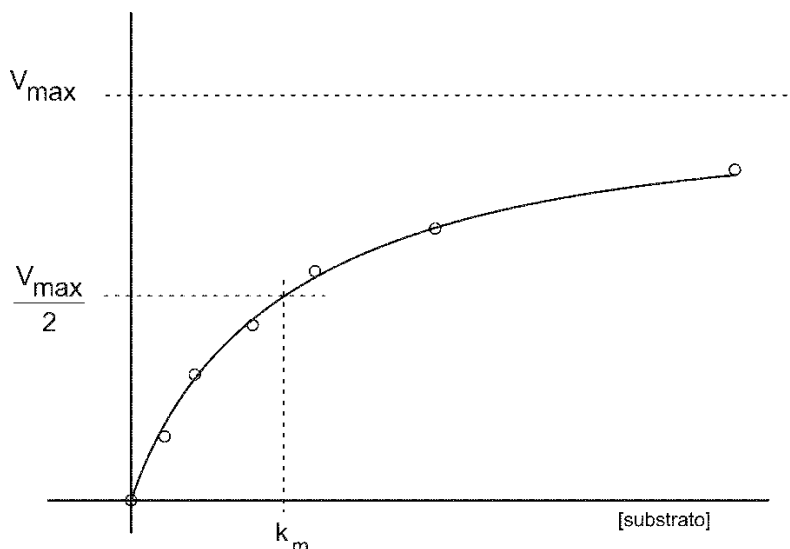


Figura 2.5 - Cinética de Michaelis-Menten

2.6 Controlo da Alimentação ao Reator por Monitorização do pH

Este mecanismo de controlo do reator de acumulação consiste na monitorização do pH ao longo do tempo, onde a análise dos valores obtidos pelo sensor, indica o momento ótimo para a alimentação de substrato.

É importante, então, em primeiro lugar, entender quais são as causas para a variação do pH nesta fase do processo e, em segundo lugar, perceber qual será o comportamento esperado no decorrer da acumulação, de forma a conseguir, não só, automatizar como, se possível, otimizar o processo. Assim, as possíveis causas são: a alimentação e consumo do substrato (composto por uma mistura de VFA); o consumo de NH_3 ; a produção de CO_2 . O consumo do substrato por parte da cultura vai causar um decréscimo na concentração de H^+ da solução. Pelo contrário, a assimilação de NH_3 aumenta a concentração do ião de hidrogénio. A produção de CO_2 e a sua consequente acumulação na fase líquida aumenta também o pH da solução, através de sistemas ácido/base ³⁰.

Em condições normais, ignorando a possível inibição por excesso de substrato, se o substrato fosse alimentado todo no início do processo e não havendo qualquer controlo, o pH do sistema iria decrescer abruptamente e, quando o valor mínimo fosse atingido, o pH teria tendência para aumentar até atingir o valor inicial demonstrando que o consumo do substrato é o principal fator a influenciar esta condição. Assim, de forma a aumentar a produtividade do processo, o método de alimentação ao reator e a composição dos VFA devem ser tidos em conta, como já foi referido no subcapítulo anterior.

Se o momento de alimentação de um novo pulso não for o correto e ocorrer antes do consumo total do pulso anterior, irá existir, possivelmente, acumulação dos ácidos menos preferenciais dentro do reator. Tal situação levará à diminuição do pH do meio podendo influenciar negativamente o controlo do processo.

Na Tabela 2.6 estão representados alguns valores de produtividade volumétrica de ensaios de produção de PHA com controlo da alimentação baseado na monitorização do pH ao longo do tempo. Observa-se que existem algumas diferenças entre os mesmos, algo que poderá estar relacionado com a seleção da biomassa utilizada ou mesmo com o tipo de substrato. As produtividades estão numa gama de valores entre 0,02 e 0,28 gPHA por litro de reator por hora.

Tabela 2.6 - Produtividades volumétricas de ensaios de produção de PHA com controlo de alimentação baseado na monitorização do pH

Fonte de Carbono	% PHA	Produtividade Volumétrica (gPHA/L.h)	Fontes
Acetato	69-80%	0,11-0,20	40
VFA e Lactato	-	0,03-0,28	39
VFA	17-39%	0,02-0,06	46
Produção de Papel	43-48%	0,09-0,13	50

2.6.1 Alimentação por Pulsos baseada na Monitorização do pH

O principal objetivo deste método de alimentação é contribuir para que a concentração de substrato presente no meio atinja valores controlados de forma a aumentar a velocidade média de consumo de substrato e, ao mesmo tempo, evitar a inibição por excesso de substrato, tornando-se desta forma essencial, definir bem o volume alimentado por pulso.

Neste tipo de alimentação a indicação do momento para a introdução de um novo pulso é dada quando um valor de *setpoint* de pH é atingido, como se pode observar na Figura 2.6, onde está representado um perfil de um processo de produção de PHA real através da monitorização e controlo do sinal de pH. O perfil apresentado na figura foi obtido com auxílio do programa desenvolvido para o controlo deste processo.

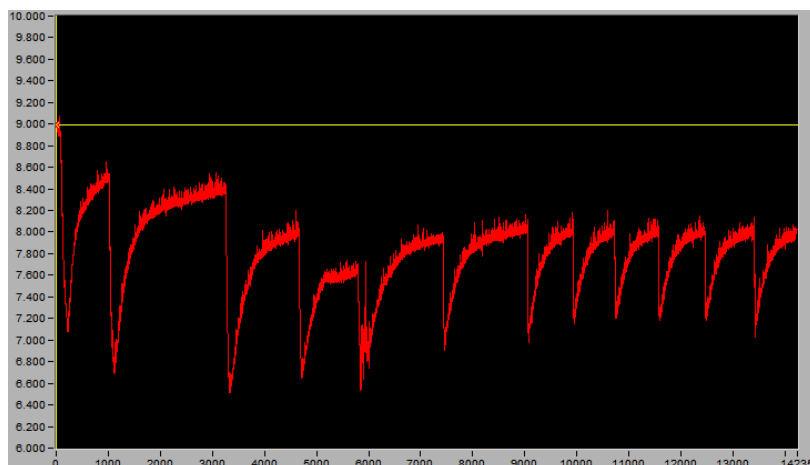


Figura 2.6 - Comportamento esperado utilizando alimentação por pulsos controlada por pH (perfil retirado do programa desenvolvido nesta dissertação)

Algoritmos deste tipo deverão funcionar da seguinte forma: quando o programa inicia a bomba é ligada de forma a ser alimentado o 1º pulso de substrato. A partir desse ponto dá-se início à recolha de valores de pH ao longo do tempo. Quando o valor de pH no momento é igual ou superior ao *setpoint* a bomba liga novamente.

2.7 Controlo da Alimentação ao Reator por Monitorização do DO

Este método é aplicado de forma semelhante ao mencionado no subcapítulo anterior com a diferença de que, neste caso, o controlo é feito com base na quantidade de oxigénio dissolvido no meio e não ao pH ³²⁻³⁴.

A concentração de DO é altamente sensível à alimentação de substrato tornando possível a aplicação deste método, através da monitorização *online* deste valor ao longo do tempo de acumulação ^{30,55,56}. Para produzir PHA a cultura precisa de consumir o substrato alimentado e simultaneamente a esse consumo os microrganismos consomem também oxigénio. É importante referir, ainda, que o oxigénio poderá ser consumido pela cultura para garantir a manutenção da mesma. Assim, a concentração de DO vai ser um indicativo da atividade da cultura. Quando é alimentado o substrato, o oxigénio dissolvido vai diminuir rapidamente até atingir um valor mínimo, onde, idealmente, irá permanecer até o substrato se esgotar. Nesse momento existe um aumento abrupto no valor de DO, tornando perceptível quando é necessário introduzir mais um pulso.

É importante ter em conta que, quando existe crescimento o valor de DO pode ser influenciado, em parte, pela atividade metabólica criada neste sentido. Contudo, no caso presente, o reator de acumulação não é alimentado com os nutrientes necessários para promover o crescimento celular, pelo que podemos assumir que as variações no valor de DO se devem exclusivamente ao consumo de VFA para a produção de PHA ⁵⁵.

Na Tabela 2.7 estão representados valores de produtividade volumétricas de ensaios de produção de PHA com controlo de alimentação baseado na monitorização do valor de DO ao longo do tempo. Estes estão numa gama de 0,01 a 0,52, valores esse mais elevados quando comparados aos obtidos da bibliografia para ensaios com controlo baseado na monitorização do pH.

Tabela 2.7 - Produtividades volumétricas de ensaios de produção de PHA com controlo de alimentação baseado na monitorização do DO

Fonte de Carbono	% PHA	Produtividade Volumétrica (gPHA/L.h)	Fontes
VFA	14-51%	0,01-0,07	44
VFA	52%	0,46	45
Acetato	15-79%	0,52	48
Lamas Secundárias	57%	0,31	51

2.7.1 Alimentação por Pulsos Controlada pelo Declive

Tendo em conta a elevada sensibilidade do valor de DO em relação à atividade da cultura existe a hipótese de estimar o momento ideal para a introdução de um novo pulso utilizando a monitorização deste ao longo do tempo.

Este método baseia-se no cálculo do declive dos últimos x pontos obtidos pelo sensor de medição de DO. Quando esse valor ultrapassa um *setpoint*, definido pelo utilizador, indica a necessidade de substrato no meio e, assim, a bomba liga, alimentando o reator.

A Figura 2.7 representa o comportamento esperado numa acumulação de PHA fazendo monitorização ao DO, o perfil apresentado foi retirado de um processo de produção real e obtido com auxílio do programa desenvolvido para o controlo. Os picos presentes demonstram o que acontece ao valor de DO quando o substrato no meio se esgota e é bem visível que o declive da função de valores de DO aumenta bruscamente nesses pontos, tornando possível este tipo de controlo.

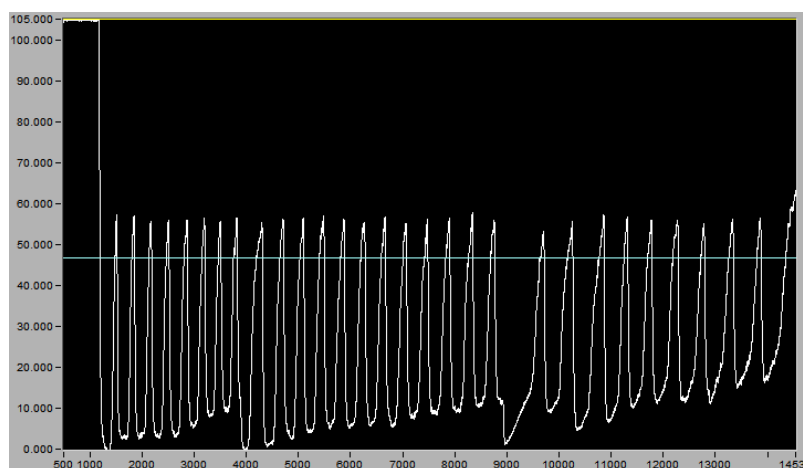


Figura 2.7 - Comportamento esperado utilizando alimentação por pulsos controlada por DO (perfil retirado do programa desenvolvido nesta dissertação)

Alimentação por Pulsos Controlada pelo Parâmetro δ

De forma semelhante ao subcapítulo 2.7.1, este método de alimentação baseia-se na monitorização do valor de DO ao longo do tempo e tem como objetivo estimar o momento ótimo para a introdução de um novo pulso de substrato. Este processo segue os seguintes passos: Primeiro, é guardado o valor de DO inicial do meio, representado

como DO_i. Posteriormente, e em cada pulso, é calculado o valor de mínimo atingido (DO_{min(i)}). O parâmetro de controlo $\delta(t)$ é, então, calculado segundo a equação 1. A decisão é feita comparando este valor ao parâmetro de controlo δ^* , definido pelo utilizador no início da acumulação. Quando o $\delta(t)$ é maior ou igual ao δ^* , é alimentado um novo pulso ⁵⁵.

Equação 1 - Parâmetro de decisão δ

$$\delta(t) = \frac{DO_t - DO_{\min(i)}}{DO_i - DO_{\min(i)}}$$

A figura 2.6 ilustra os valores utilizados para o cálculo do parâmetro de controlo δ .

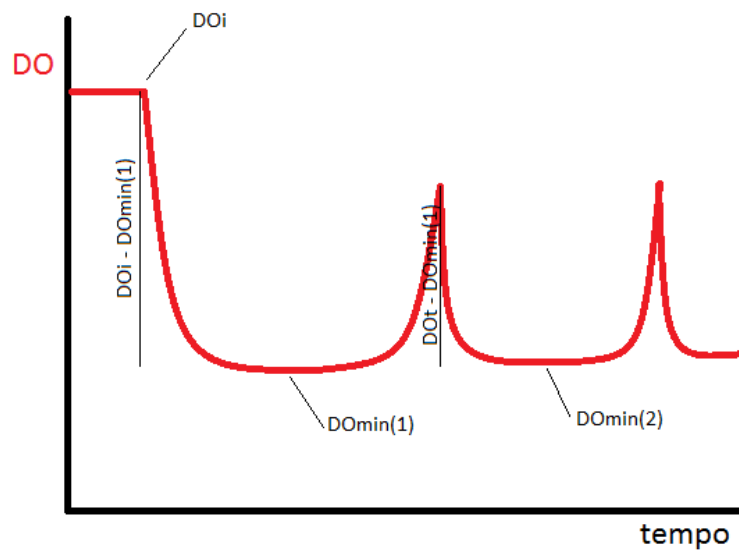


Figura 2.8 - Ilustração dos valores usados para o cálculo do parâmetro δ

2.8 Alimentação Contínua

Esta forma de alimentação ao reator passa pela introdução contínua de substrato, a um caudal definido previamente³¹. Tendo em conta a quantidade de substrato que o utilizador deseja alimentar em toda a fase de acumulação e o caudal de débito da bomba, é definido então um caudal de alimentação constante. Neste tipo de alimentação é essencial que o caudal selecionado seja calculado com rigor, de forma a evitar uma concentração muito baixa ou muito alta de substrato no reator que levará a um decréscimo da produtividade do processo ³¹.

É importante referir que existem poucas fontes bibliográficas acerca deste método de alimentação, possivelmente porque é difícil garantir uma boa produtividade com um caudal fixo ao longo de todo o processo, visto que a velocidade de consumo de substrato irá variar com o tempo. Outra limitação que se poderá criar com a alimentação contínua de VFA ao reator será a acumulação dos ácidos menos preferenciais.

3 Materiais e Métodos

O objetivo deste capítulo é apresentar as metodologias utilizadas para a realização da parte experimental desta dissertação. Para além dos protocolos seguidos para as atividades laboratoriais, serão também apresentados os algoritmos propostos para o controlo do processo de produção de PHA por MMC.

3.1 Objetivos Comuns

Apesar de cada método de controlo, a nível de programação e cálculo matemático, funcionar de forma distinta, existem objetivos de decisão comuns:

- Tempo de espera inicial, $T_{Contador}$: Este tempo é introduzido como contador para o início do processo, ou seja, quando os parâmetros estão todos introduzidos e o programa é iniciado, começa uma contagem que quando terminada inicia o processo de alimentação, ligando a bomba.
- Tempo de Bomba Ligada, $T_{BombaLigada}$: O tempo de bomba ligada define o volume total de substrato adicionado, seguindo a seguinte equação:

$$V_{Substrato\ por\ pulso}(L) = Q_{Bomba}(L/s) \times T_{BombaLigada}(s)$$

Equação 2 - Volume de Substrato Adicionado por Pulso

- Tempo de Bomba Desligada, $T_{BombaDesligada}$: é considerado este tempo de forma a evitar que a bomba ligue e desligue em períodos demasiado pequenos. NOTA: se o objetivo for alimentar pulsos pequenos, este valor pode ser zero.

3.2 Algoritmos de Controlo

Neste capítulo serão apresentados os diferentes algoritmos propostos para a automação do processo de alimentação ao reator de acumulação. Estes algoritmos apenas se focam no tratamento dos dados recebidos de forma a estimar o momento correto de introdução de um novo pulso. A teoria de controlo relacionada com este tipo de algoritmos é controlo *on/off*.

3.2.1 1º Algoritmo: Controlo *On/Off* por *setpoint* de pH

Este algoritmo baseia-se na monitorização *online* do pH, onde é pré-estabelecido um *setpoint* que, quando ultrapassado, indica a necessidade de uma nova alimentação de substrato ao meio.

A atribuição do valor de pH_{sp} tem de ser bem ponderada, de forma a não ser um valor demasiado elevado, pois nesse caso o *setpoint* poderá nunca ser atingido fazendo com que não haja alimentação. Este valor também não poderá ser demasiado baixo pois nesse caso a alimentação será feita demasiado cedo, o que irá levar a uma acumulação de VFA não consumidos.

Parâmetros Necessários

1. *Setpoint* de pH (pH_{sp});
2. Tempo de Espera Inicial ($T_{Contador}$);
3. Tempo de Bomba Ligada ($T_{BombaLigada}$);
4. Tempo de Mínimo de Bomba desligada ($T_{BombaDesligada}$);
5. Tempo Máximo de Acumulação (τ);
6. Número de Pontos para o Cálculo da Média ($N_{P, média}$).

Modo de Funcionamento

De forma a iniciar a acumulação o utilizador tem de introduzir os parâmetros indicados anteriormente. Após a introdução dos parâmetros o programa arranca, iniciando a recolha dos valores de pH da solução, e aguarda o tempo $T_{Contador}$, nesta fase a bomba encontra-se desligada. Posteriormente a bomba de alimentação do substrato é ligada e assim se mantém até ser atingido o tempo $T_{BombaLigada}$. Tendo em conta o caudal fixo da bomba utilizada, o tempo de bomba ligada é que vai determinar o volume total de substrato adicionado por pulso, segundo a Equação 2.

Quando o $T_{BombaLigada}$ é atingido a bomba é desligada e o programa aguarda o $T_{BombaDesligada}$. Após o tempo mínimo de bomba desligada, é iniciado o cálculo da média do valor de pH utilizando os últimos x pontos definidos no parâmetro $N_{P, média}$. A utilização de um número de pontos para o cálculo da média é introduzida no código de forma a tentar atenuar o ruído do sinal obtido pela sonda de pH. Neste caso, a média serve como filtro de sinal para ruído branco, ou seja, ruído que tem média de zero.

Nesta fase o programa atinge um ponto de decisão. Tendo em conta a comparação do valor do pH_{sp} , definido pelo utilizador, com o valor de pH médio poderá ser ligada novamente a bomba, dando mais um pulso de substrato. O critério de decisão diz que se o pH médio for maior que o pH_{sp} a bomba liga, enquanto esse critério não for obedecido o programa continua a recolha de valores de pH e atualiza a média.

Neste algoritmo existem duas formas de terminar a acumulação, a primeira ocorre quando o tempo máximo de acumulação é atingido e a segunda hipótese quando o utilizador parar o programa manualmente.

Diagrama de Fluxo de Dados

Na Figura 3.1 está representado o diagrama de fluxo de dados do 1º algoritmo. Desta forma é possível observar a direção que as informações retiradas tomam e como é que estas atingem o parâmetro de decisão.

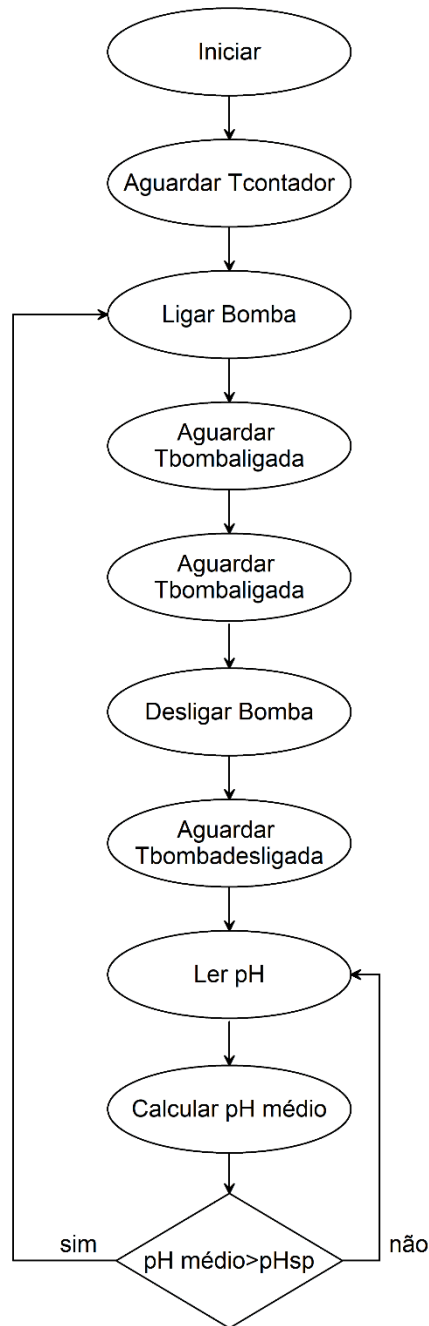


Figura 3.1 - Diagrama de fluxo do 1º Algoritmo

3.2.2 2º Algoritmo: Controlo On/Off por *setpoint* de DO e declive

O primeiro algoritmo de monitorização do DO baseia-se, como já foi referido, nos valores de DO ao longo do tempo e no calculo do declive de uma série de pontos já adquiridos. Mais uma vez, o controlo é feito à bomba de alimentação e a quantidade de substrato adicionada por pulso é definida pelo utilizador segundo a Equação 2.

Inicialmente o algoritmo foi pensado de forma ao único critério de decisão de alimentação ser o *setpoint* de declive, no entanto, foi adicionado como critério paralelo a média do valor de DO com o objetivo de tornar este controlo mais robusto.

Constatou-se que, por vezes, no reator de seleção, o perfil de DO se comportava apresentando patamares no momento de recuperação do mesmo. Foi observado que quando esgotados os VFA no reator, em vez de o valor de DO subir para o seu valor inicial, este subia por diferentes patamares, provavelmente correspondentes à mudança do tipo de VFA a ser consumido. Como referido anteriormente existem diferentes fatores que afetam o modo de consumo do substrato e alguns VFA parecem ser consumidos preferencialmente em relação a outros. Quando os VFA considerados preferenciais se esgotam a cultura consome os restantes ainda presentes no reator e essa mudança no consumo leva a alterações no perfil de DO.

Assim, com a inclusão de um parâmetro que tem em conta a média do valor de DO, é possível evitar a alimentação antes do consumo de todos os VFA num dado pulso.

Parâmetros Necessários

1. *Setpoint* de declive (D_{sp});
2. *Setpoint* de DO (DO_{sp});
3. Tempo de Espera Inicial ($T_{Contador}$);
4. Tempo de Bomba Ligada ($T_{BombaLigada}$);
5. Tempo de Mínimo de Bomba desligada ($T_{BombaDesligada}$);
6. Tempo Máximo de Acumulação (τ);
7. Número de Pontos para o Cálculo do Declive ($N_{P, Declive}$).

Modo de Funcionamento

De forma a iniciar a acumulação o utilizador deve introduzir os parâmetros indicados anteriormente. Após a introdução dos parâmetros o programa arranca, iniciando a recolha dos valores de DO da solução e aguarda o tempo $T_{Contador}$, nesta fase a bomba encontra-se desligada. Posteriormente a bomba de alimentação do substrato é ligada e assim se mantém até ser atingido o tempo $T_{BombaLigada}$.

Quando o $T_{BombaLigada}$ é atingido a bomba é desligada e o programa aguarda o $T_{BombaDesligada}$. Após o tempo mínimo de bomba desligada, é iniciado o cálculo do declive e da média dos últimos x pontos de DO adquiridos. De forma semelhante ao 1º algoritmo de pH, a utilização de um número de pontos para o cálculo do declive e da média é introduzida no código de forma a tentar atenuar o ruído do sinal obtido pela sonda.

Nesta fase o programa atinge um ponto de decisão. Tendo em conta a comparação dos valores de D_{sp} e DO_{sp} , definidos pelo utilizador, com os valores obtidos no momento pelo programa, poderá ser ligada a bomba, dando um novo pulso de substrato. O critério de decisão diz que se o declive calculado e a média do DO forem maiores que os parâmetros, D_{sp} e DO_{sp} , a bomba liga, enquanto esse critério não for obedecido o programa continua a recolha de valores de DO e atualiza os parâmetros utilizados. Neste algoritmo, a acumulação termina quando o tempo máximo de acumulação for atingido ou quando o utilizador entender.

Diagrama de Fluxo

Na Figura 3.2 está representado, de forma análoga ao 1º algoritmo, o diagrama de fluxo de dados do 2º algoritmo.

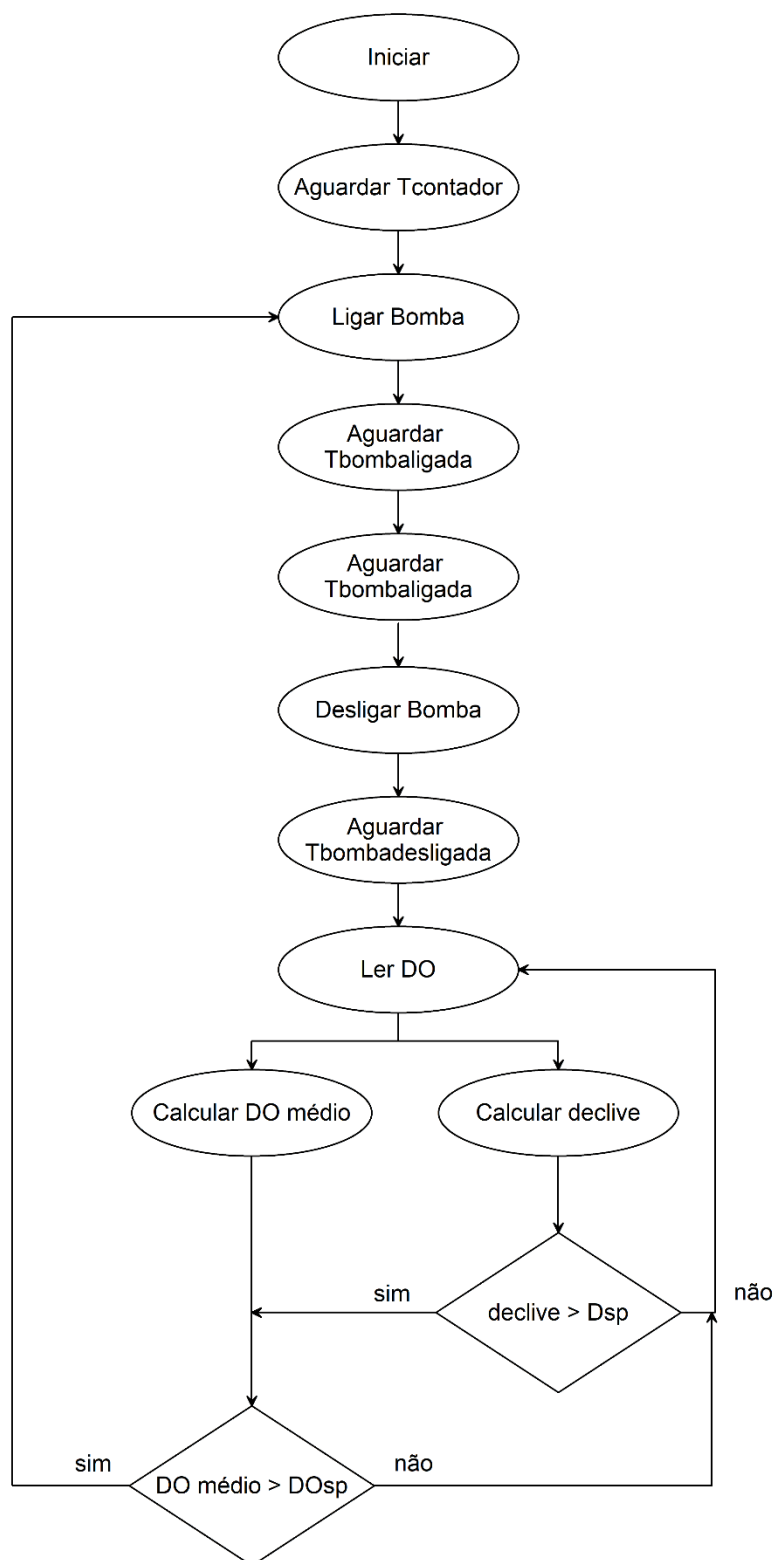


Figura 3.2 - Diagrama de fluxo do 2º algoritmo

3.2.3 3º Algoritmo: Controlo *On/Off* através do Parâmetro δ

Este algoritmo baseia-se nas informações obtidas na patente US 2013/0029388A1 de 31 de janeiro de 2013 ⁵⁵. Neste método existem novos parâmetros a serem considerados, o valor de DO inicial (DO_i), o valor de DO mínimo atingido depois de cada pulso ($DO_{min(i)}$) e o parâmetro de controlo δ^* .

Ao longo de uma acumulação é esperado que, com a redução da atividade da cultura o valor mínimo de DO atingido ao fim de um pulso vá aumentando gradualmente. Como este algoritmo tem em consideração a progressão do valor mínimo de DO, poderá evitar alguma falha de controlo associada a essa subida. Por exemplo, utilizando o algoritmo anterior, se o valor de DO_{sp} for suficientemente baixo poderá acontecer que, após a adição de um pulso, o DO mínimo atingido seja superior ao valor do DO_{sp} . Nesse caso o programa entraria num *loop* de alimentação em que quando acabasse o $T_{BombaDesligada}$ iria assumir que era o momento indicado para a introdução de mais um pulso. O objetivo do algoritmo aqui apresentado é adaptar o controlo da alimentação às alterações do meio.

Parâmetros Necessários

1. Tempo de Espera Inicial ($T_{Contador}$);
2. Tempo de Bomba Ligada ($T_{BombaLigada}$);
3. Tempo de Mínimo de Bomba desligada ($T_{BombaDesligada}$);
4. Parâmetro de Controlo (δ^*);
5. Tempo Máximo entre pulsos (T_{pulsos}).

Modo de Funcionamento

De forma a iniciar a acumulação o utilizador deve introduzir os parâmetros indicados anteriormente. Após a introdução dos parâmetros o programa arranca, iniciando a recolha dos valores de DO da solução e aguarda o tempo $T_{Contador}$, nesta fase a bomba encontra-se desligada. Posteriormente, é recolhido o valor de DO_i , a bomba de alimentação do substrato é ligada e assim se mantém até ser atingido o tempo $T_{BombaLigada}$.

Quando o $T_{BombaLigada}$ termina é guardado o valor de DO_{min} atingido e entra-se na contagem do $T_{BombaDesligada}$. Importante notar que durante estes períodos o valor de DO continua a ser gravado pelo programa. Após terminar o $T_{BombaDesligada}$ inicia-se o cálculo do valor de $\delta(t)$ utilizando a Equação 1. O critério de decisão deste algoritmo diz que se $\delta(t)$ for maior ou igual ao δ^* a bomba liga e o processo volta ao início.

Diagrama de Fluxo

De forma a ser mais simples perceber o funcionamento do 3º algoritmo, na Figura 3.3 está representado o diagrama de fluxo de dados do mesmo.

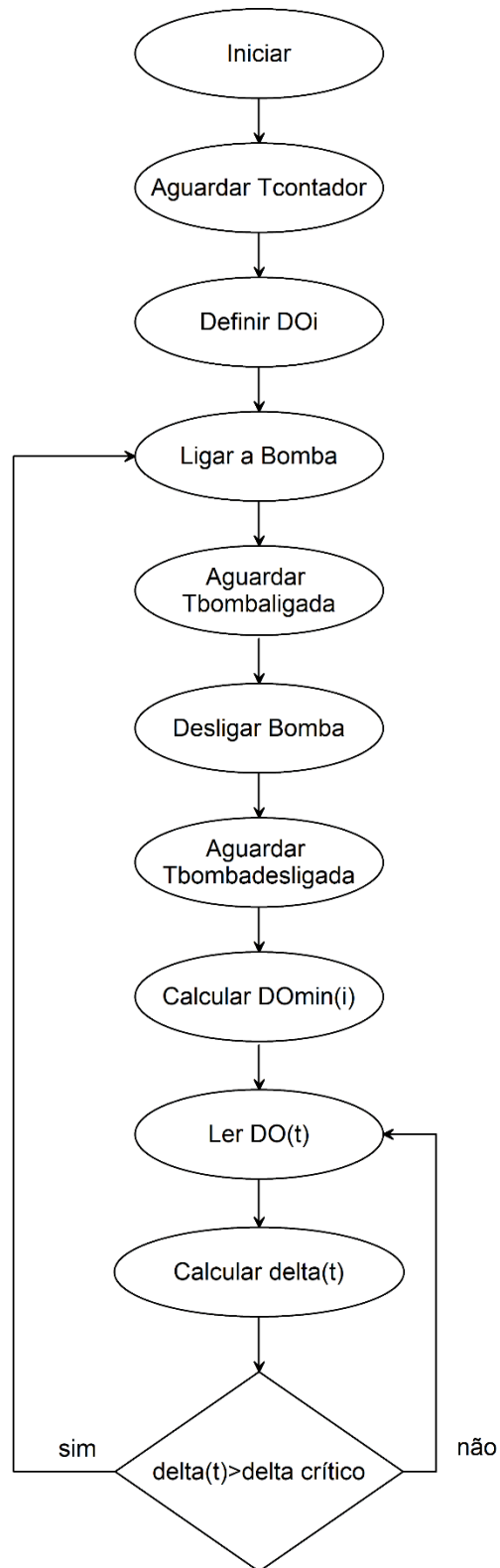


Figura 3.3 - Diagrama de fluxo do 3º algoritmo

3.2.4 4º Algoritmo: Alimentação Contínua

O quarto algoritmo proposto apresenta a 1ª hipótese de alimentação contínua. Neste caso o caudal de alimentação da bomba permanece constante ao longo de toda a acumulação.

Parâmetros Necessários

1. Tempo de Espera Inicial (T_{Contador});
2. Caudal de Substrato Alimentado (Q_s);
3. Tempo Máximo de Alimentação.

Será possível que a produtividade do processo aumente se o valor do caudal for alterado em diferentes tempos do processo. Inicialmente, como ainda não existiu produção de PHA, a velocidade de consumo de substrato será superior, assim o caudal da bomba Q1 é definido. À medida que a acumulação ocorre a velocidade de consumo vai diminuir também, assim poderá ser necessário diminuir o caudal da bomba de forma a evitar alimentação em excesso.

Existe a hipótese de fazer monitorização ao pH ou ao DO simultaneamente, de forma a estimar variações na velocidade de consumo de substrato, com o objetivo de controlar o caudal da bomba, sendo assim possível atenuar a inibição da cultura por excesso de substrato.

3.3 Preparações e Protocolos Experimentais

Neste subcapítulo serão apresentadas as preparações experimentais para os ensaios de produção, bem como os protocolos seguidos no tratamento das amostras retiradas nos mesmos.

3.3.1 Preparação Experimental

De forma a testar o funcionamento dos materiais necessários para os ensaios de acumulação, bem como dos algoritmos propostos, foi preparada uma montagem laboratorial em pequena escala utilizando um reator com a constituição semelhante à representada na Figura 3.4. O volume total do reator é de 600 mL. Foram utilizados dois dispersores de ar, duas bombas de ar e uma pá de agitação, não só para garantir a presença de oxigénio suficiente, como também para reduzir o tamanho das bolhas e homogeneizar o oxigénio dissolvido no meio. Entre ensaios o reator foi lavado de forma a evitar a presença, tanto de VFA como de biomassa.

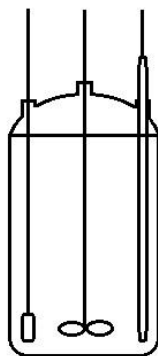


Figura 3.4 - Reator de escala laboratorial

Ativação da Biomassa

Nos ensaios efetuados no reator de pequena escala a biomassa utilizada foi previamente armazenada numa arca frigorífica a 6 °C, pois nessas condições é possível mantê-la funcional durante um período elevado, sem ser necessária a introdução de substrato ou de compostos responsáveis pelo crescimento da cultura.

Antes do início de cada ensaio foi, então, necessário reativar a biomassa da seguinte forma:

- Retirou-se 200 mL de biomassa para uma proveta;
- Diluiu-se a biomassa com 100 mL de água;
- Preparou-se um pulso de ativação composto por 600 µL de uma solução de amónia + fósforo e 574 µL de ácido butírico;
- Colocou-se a biomassa no reator;
- Alimentou-se o pulso de ativação.

Depois de concluído o procedimento anterior esperou-se que o pulso de ativação fosse totalmente consumido, representado pela subida do DO ou do pH para o valor prévio à introdução do pulso.

Preparação da Alimentação

O substrato utilizado na parte experimental desta dissertação foi proveniente de um reator de fermentação anaeróbia existente no mesmo laboratório. O produto desse reator é um efluente que contém VFA, água, sólidos da polpa e outros compostos em quantidades residuais, na Tabela 3.1 está representada a composição típica do substrato utilizado ao longo dos ensaios. Tendo em conta que os sólidos da polpa são inertes, a sua presença na solução alimentada não é desejada e, como tal, utilizou-se um sistema de filtração para reduzir a sua percentagem no volume do substrato, utilizando um filtro de tecido de flanela para o efeito.

A concentração média do substrato ao longo dos ensaios foi de 21,9 gCQO/L.

Tabela 3.1 - Composição típica do substrato utilizado

Ácido Láctico	Ácido Acético	Ácido Propiónico	Etanol	Ácido Butírico	Ácido Valérico
0%	26%	5%	5%	60%	4%

Preparação Experimental 2

Com o objetivo de estudar o desempenho nos ensaios de acumulação automatizados pelos algoritmos de controlo foram realizados vários ensaios num reator de escala piloto com aproximadamente 65 L de volume total. Foi utilizado um compressor com o objetivo de adicionar ar ao reator, um motor ligado duas pás de agitação, de forma a dispersar o ar adicionado e reduzir o tamanho das bolhas formadas, um sensor de medição de pH e um sensor de medição de DO, estes últimos para tornar possível a monitorização *online* destes parâmetros. Em cada ensaio foram introduzidos 25 L de biomassa proveniente do reator de seleção SBR. Como a biomassa utilizada, extraída do SBR, era imediatamente

colocada no reator de acumulação sob agitação e com fornecimento de oxigénio, não foi necessário dar o pulso de ativação, como nos ensaios da preparação experimental 1.

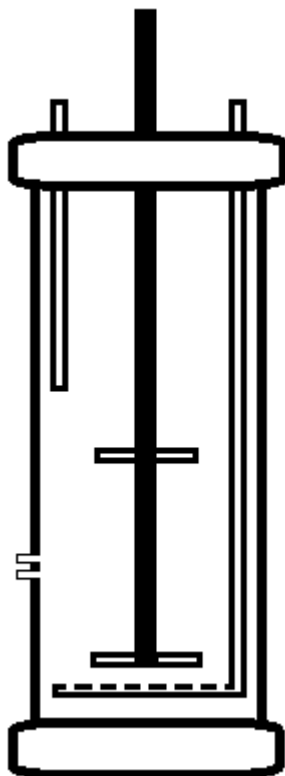


Figura 3.5 - Reator de escala piloto

3.3.2 Protocolos Experimentais

Peso Total de Sólidos e Peso seco de Célula

De forma a descobrir a concentração de biomassa e a quantidade total de polímero produzida ao longo de uma acumulação foram calculados os TSS e VSS. Seguiu-se o protocolo de acordo com as seguintes referências ^{25,36,50}.

Para tal, começou-se por pesar um cadinho com um filtro de microfibras de vidro (Whatman 1.2 µm). Posteriormente, retirou-se um volume de amostra do reator utilizando uma micropipeta e filtrou-se num filtro de vácuo. De forma a eliminar o sobrenadante presente na amostra colocou-se o cadinho numa estufa a 100 °C durante a noite. Pesou-se, então o cadinho retirando o peso total de sólidos mais o peso do cadinho e filtro. De seguida, colocou-se o cadinho numa mufla a 550 °C durante 2 horas e voltou-se a pesar o cadinho no final. Retirados os pesos necessários calcularam-se os TSS e os VSS de acordo com as equações apresentadas de seguida:

$$TSS = \frac{Peso_{Inicial} - Peso_{(100^{\circ}C, 12h)}}{Volume_{Amostra}} \quad VSS = \frac{Peso_{(100^{\circ}C, 12h)} - Peso_{(550^{\circ}C, 3h)}}{Volume_{Amostra}}$$

Concentração de VFA

Para se determinar a concentração dos VFA, em cada amostra retirada, foi necessário efetuar uma Cromatografia Líquida de Alta *Performance* (HPLC). Neste caso o objetivo é quantificar os ácidos em diferentes momentos da acumulação e, para tal, são utilizadas as amostras já filtradas. Utilizou-se o método de acordo com o retirado das seguintes referências ^{25,36,42}.

Para começar filtraram-se as amostras retiradas do reactor, de forma a reduzir ao máximo a quantidade de sólidos. Utilizaram-se as seguintes condições para o HPLC: Temperatura da coluna: 30 °C, Efluente de H₂SO₄ 0.01M e Caudal: 0.5 mL/min.

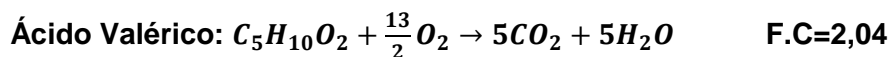
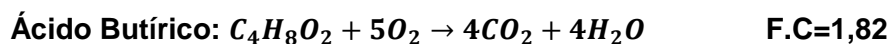
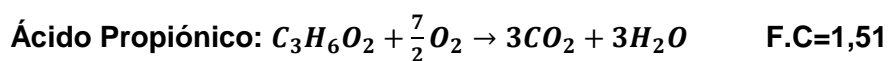
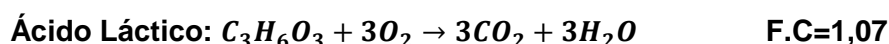
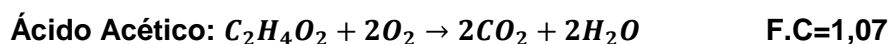
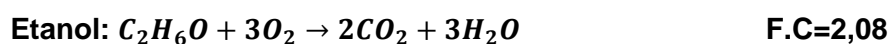
No final as concentrações dos VFA foram calculadas por intermédio de curvas de calibração (15-1000 mg/L de cada composto).

Carência Química de Oxigénio (CQO)

De forma a se conseguir comparar alguns parâmetros optou-se por passar unidades de massa ou concentração para CQO. Este valor é utilizado em química ambiental, especialmente em tratamento de águas residuais como um parâmetro de avaliação da matéria orgânica existente nos efluentes e é calculado através da oxidação total de uma molécula orgânica ⁵⁷. O fator de conversão foi obtido utilizando a Equação 3 e as reações químicas seguintes. O parâmetro “q” na Equação 3 representa o coeficiente estequiométrico no acerto da reação.

$$\frac{gCQO}{gVFA} = \frac{qO_2 \times M(O_2)}{qVFA \times M(VFA)}$$

Equação 3 - Fator de Conversão de gVFA para gCQO



Conteúdo do PHA Produzido

Para se determinar a concentração de cada monómero constituinte do PHA produzido foi efetuada uma cromatografia gasosa. O objetivo era quantificar as percentagens de hidroxibutirato (HB) e hidroxivalerato (HV) no polímero final. Utilizou-se o método descrito nas seguintes referências ^{30,32}.

Inicialmente centrifugou-se uma amostra retirada do reator (10000 rpm, durante 3 minutos) separando a biomassa do sobrenadante não pretendido. Liofilizou-se a

biomassa durante a noite e, posteriormente, esta foi encubada em 1 mL de uma solução 20% de H₂SO₄, depois extraiu-se usando 1 mL de clorofórmio. A mistura foi, então, digerida a 100 °C durante 3.5 horas. Depois da fase de digestão, a fase orgânica foi extraída e injetada (2 µL) num cromatografo gasoso equipado com um flame ionization detector (Bruker 430-GC) e uma BR-SWax column (60 m, 0.53 mm de diâmetro interno, 1 mm de espessura de filme, Bruker USA). Utilizou-se Hélio como fase móvel a um caudal de 1 mL/min. Como temperatura inicial usou-se 40°C e usou-se um incremento de 20°C/minuto até se atingir os 100°C, posteriormente aumentou-se a temperatura a uma taxa de 3 °C/min até aos 175 °C e, finalmente, foi atingida uma temperatura final de 220 °C, aplicando, novamente, um incremento de 20°C/min. A coluna foi limpa depois de cada injeção. Para determinar as concentrações de cada ácido utilizaram-se curvas de calibração.

Acidificação e Armazenamento da Biomassa

No final de cada ensaio de produção à escala piloto foi necessário acidificar a biomassa retirada do reator no final do processo antes de a colocar num bidão, onde esta era armazenada. Procedeu-se a essa acidificação para evitar que, quando o processo terminasse, a biomassa começasse a consumir o PHA produzido para sobreviver.

Assim, no final de cada acumulação adicionou-se ácido sulfúrico com 98% de concentração até que a mistura final ficasse com um pH a rondar os 3.

3.4 Indicadores de Rentabilidade

Produtividade Volumétrica Média

$$Produtividade\ Volumétrica_{Média} = \frac{PHA_{final} - PHA_{inicial}}{V_{final} \times t_{acumulação}} \left(\frac{gPHA}{L \times h} \right)$$

Equação 4 - Cálculo da produtividade volumétrica média

Produtividade Volumétrica por Pulso

$$Produtividade\ Volumétrica_{Pulso\ n} = \frac{PHA_n - PHA_{n-1}}{V_n \times t_n} \left(\frac{gPHA}{L \times h} \right)$$

Equação 5 - Cálculo da produtividade média por pulso

Produtividade Específica Média

$$Produtividade\ Específica_{Média} = \frac{PHA_{final} - PHA_{inicial}}{X_A \times t_{acumulação}} \left(\frac{gPHA}{gX_A \times h} \right)$$

Equação 6 - Cálculo da produtividade específica média

Produtividade Específica por Pulso

$$Produtividade\ Específica_{Pulso\ n} = \frac{PHA_n - PHA_{n-1}}{X_A \times t_{acumulação}} \left(\frac{gPHA}{gX_A \times h} \right)$$

Equação 7 - Cálculo da produtividade específica por pulso

Rendimento PHA/VFA

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta PHA}{\Delta VFA} \left(\frac{gCOD\ PHA}{gCOD\ VFA} \right)$$

Equação 8 - Cálculo do Rendimento PHA/VFA

3.5 LabVIEW

No âmbito desta dissertação, de forma a conseguir aplicar as diferentes metodologias propostas, foi utilizado o *software* desenvolvido pela *National Instruments™* denominado de *LabVIEW*, sendo que neste caso foi utilizada a versão de 2012. Este *software* permite ao mesmo tempo monitorizar e tratar sinais obtidos de diferentes equipamentos, como por exemplo sondas de medição de pH ou DO, e criar sistemas de automação e controlo programáveis para casos específicos. A linguagem de programação utilizada, G, baseia-se nos princípios de fluxo de dados e programação gráfica para proporcionar, simultaneamente, um ambiente de programação simples, com recurso a digramas de blocos, e uma interface gráfica ⁵⁸⁻⁶⁰.

Tendo em conta estes princípios, o programa foi usado para as seguintes funções:

- Obtenção de sinal proveniente de sondas de medição de pH e DO;
- Eliminação do ruído do sinal obtido;
- Representação do sinal já filtrado;
- Cálculo em linha para a obtenção de variáveis do processo;
- Automação de equipamentos, nomeadamente bombas e agitadores, mediante parâmetros definidos, ou pelo operador, ou dependentes das variáveis do processo.

Na Figura 3.6 observa-se a janela de monitorização do programa BioCTR onde se implementaram os algoritmos de controlo. Nesta janela é possível observar um, ou vários sinais simultaneamente e *online*.

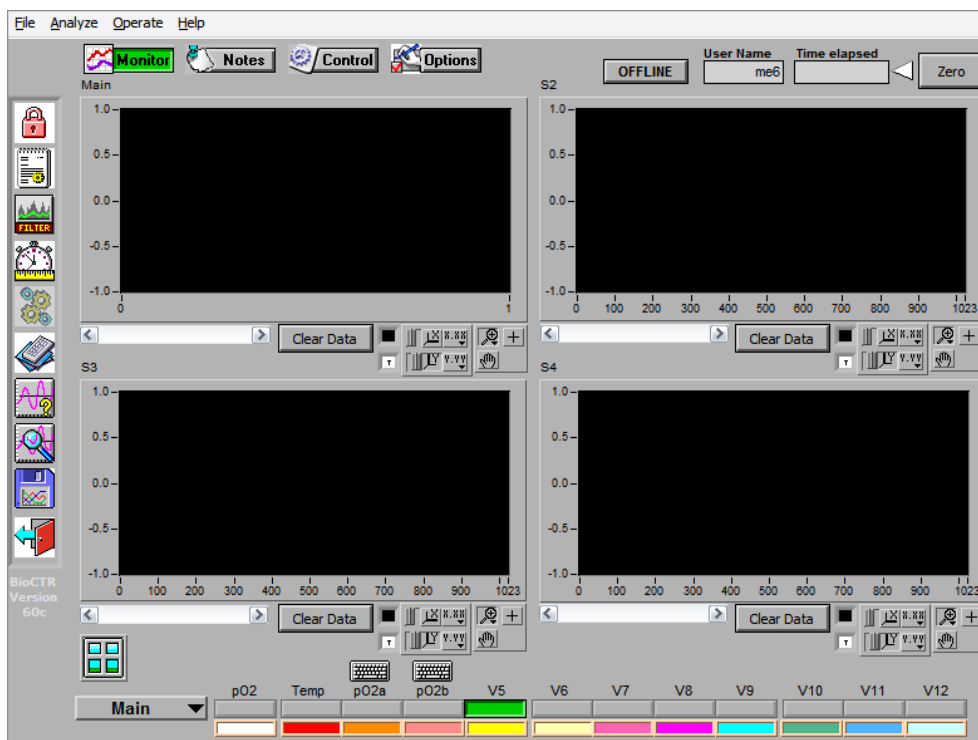


Figura 3.6 - Janela de monitorização do programa

Na Figura 3.7 está representada a janela de configuração dos parâmetros da sequência de controlo do programa BioCTR. É aqui que se selecciona o tipo de controlo desejado e que se introduzem os parâmetros de controlo específicos de cada algoritmo. O tipo de controlo é selecionado no botão "Type", já os parâmetros relacionados com os cálculos efetuados como por exemplo o N_p , média, são introduzidos no separador "Int val" e por último os parâmetros relacionados com o processo, como por exemplo os valores de *setpoint*, podem ser introduzidos no separador "Real val".

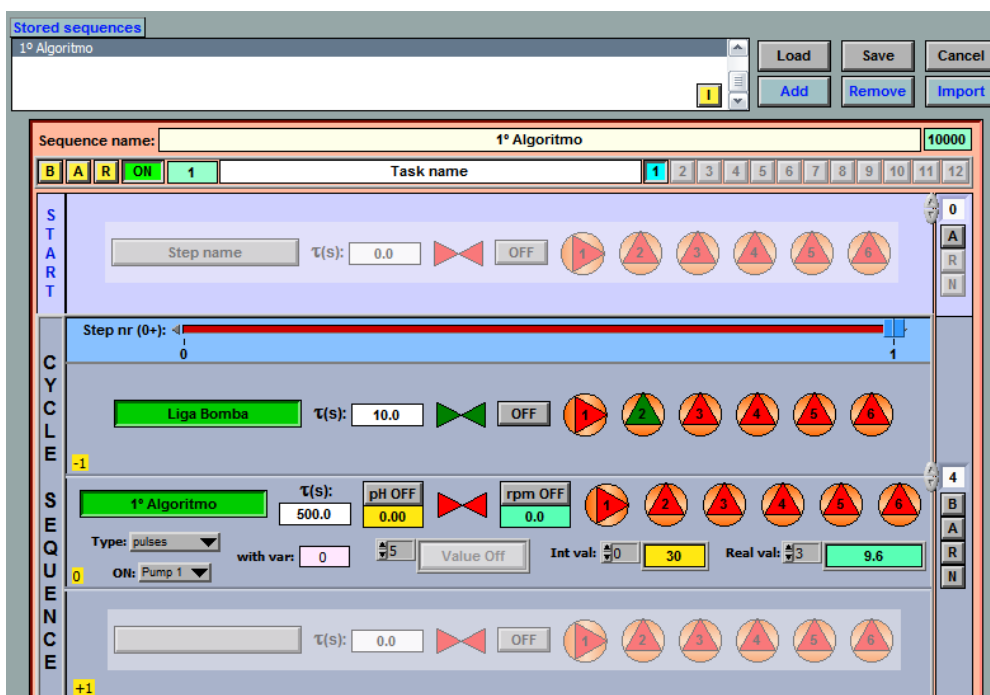


Figura 3.7 - Janela de configuração dos parâmetros da sequência de controlo

4 Discussão de Resultados

Este capítulo tem como objetivo a apresentação e discussão dos resultados obtidos relativos às atividades experimentais realizadas nesta dissertação. Como já foi referido, nas primeiras experiências, o objetivo foi de validar, à escala laboratorial, a automação dos algoritmos propostos e, na segunda bateria de experiências avaliar e analisar o desempenho dos mesmos à escala piloto.

4.1 Ensaios Preliminares de Validação dos Algoritmos

Neste subcapítulo serão analisados os resultados das experiências de validação dos algoritmos realizadas nos meses de julho e agosto de 2017. Com estes ensaios pretendia-se averiguar a existência de erros de programação nos algoritmos no *LabVIEW* que invalidassem o posterior estudo de produção à escala piloto. Para tal, estudou-se a resposta do programa de controlo, quando posto em prática, fazendo alterar os valores dos parâmetros de controlo específicos.

4.1.1 1º Algoritmo: Controlo *On/Off* por *setpoint* de pH

Realizaram-se quatro ensaios utilizando como controlo da alimentação de substrato o 1º algoritmo. As condições e parâmetros aplicados estão representados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Resumo das condições de operação e dos parâmetros utilizados nos ensaios do 1º algoritmo

Data	Volume de Biomassa + Água (mL)	Volume do Pulso (mL)	pH Inicial	pH Substrato	pH _{sp}
1.8.2017	300	10	8.64	5,0	8,6
2.8.2017	300	15	8.32	5,0	8,2
3.8.2017	300	20	8.72	5,0	8,6
4.8.2017	300	25	8.54	5,0	8,4

Inicialmente quis-se avaliar o desempenho do algoritmo, quando aplicado à escala laboratorial e tentar identificar alguns padrões que pudessem auxiliar a otimização do mesmo. Para tal, além de se ter analisado se o momento de introdução do pulso foi o indicado, também se analisaram os perfis de pH gravados no programa.

Assim, na Tabela 4.2 estão representados os resultados de validação da automação do algoritmo em estudo, onde apenas no primeiro caso o algoritmo falhou o momento de adição de um novo pulso de substrato.

Tabela 4.2 - Resultados de validação do 1º algoritmo

Data	Volume Final (mL)	Número de Pulsos	Número de Pulsos Automáticos	Tempo de Ensaio (horas)
1.8.2017	330	3	2	2.27
2.8.2017	435	9	9	5.10
3.8.2017	460	8	8	5.05
4.8.2017	475	7	7	5.50

No primeiro ensaio foi dado um total de três pulsos, onde os dois primeiros foram alimentados automaticamente quando atingido o setpoint predefinido, demonstrando que o algoritmo cumpria a função para o qual fora desenhado. No entanto, no terceiro pulso o pH_{sp} não foi atingido, logo não foi possível a adição automática de um novo pulso. Este facto é justificado pela proximidade do valor de pH_{sp} atribuído e do valor de pH máximo atingível, frisando a importância deste parâmetro para o sucesso do algoritmo quando aplicado. Se se pretendesse continuar este ensaio seria necessário o operador corrigir o *setpoint* para um valor que tornasse possível acionar o controlo automático.

Nos restantes ensaios todo o processo ocorreu de forma autónoma, não sendo necessária nenhuma alteração nos parâmetros de controlo. Como se pode observar na Tabela 4.3, nos últimos três ensaios o valor de setpoint foi ponderado com uma maior margem em relação ao valor de pH inicial. Foi utilizado um rácio pH inicial/ pH_{sp} igual a 0.014, em vez do valor de 0.005 aplicado no primeiro ensaio.

Tabela 4.3 - Rácio pH inicial/pH setpoint

Data	pH inicial	pH_{sp}	Rácio pH_i/pH_{sp}
1.8.2017	8.64	8.60	0.005
2.8.2017	8.32	8.20	0.014
3.8.2017	8.72	8.60	0.014
4.8.2017	8.54	8.42	0.014

No entanto, como se poderá observar na análise dos resultados dos ensaios de produção à escala piloto, os perfis de pH não se comportam da mesma forma que o ocorrido nestes casos de estudo. Isso poderá dever-se ao facto de a biomassa utilizada nesta fase ter sido armazenada, numa arca frigorífica, durante cerca de um mês, podendo isso afetar o comportamento normal da cultura numa fase de acumulação. Ainda assim foi possível concluir que o algoritmo não tem erros de programação e que, para posteriores ensaios, é necessário dar elevada importância à atribuição do valor de *setpoint*.

Análise dos Perfis de pH Obtidos

Em relação à análise dos perfis de pH é possível chegar a algumas conclusões. Como seria de esperar, à medida que o tempo do ensaio aumenta, a velocidade a que a cultura consome o substrato diminui, fazendo com que o tempo entre pulsos vá aumentando com uma progressão aproximadamente linear, como está representado na Figura 4.1. Isto acontece, pois, como já foi referido, à medida que a quantidade de PHA acumulado pela cultura aumenta, o efeito da inibição por produto vai-se fazendo sentir mais acentuadamente influenciando, assim, a velocidade de consumo do substrato. Poderá ainda ocorrer inibição por substrato proveniente de uma possível acumulação do mesmo, dentro do reator, ao longo da acumulação, mas esse fator não foi analisado nesta fase.

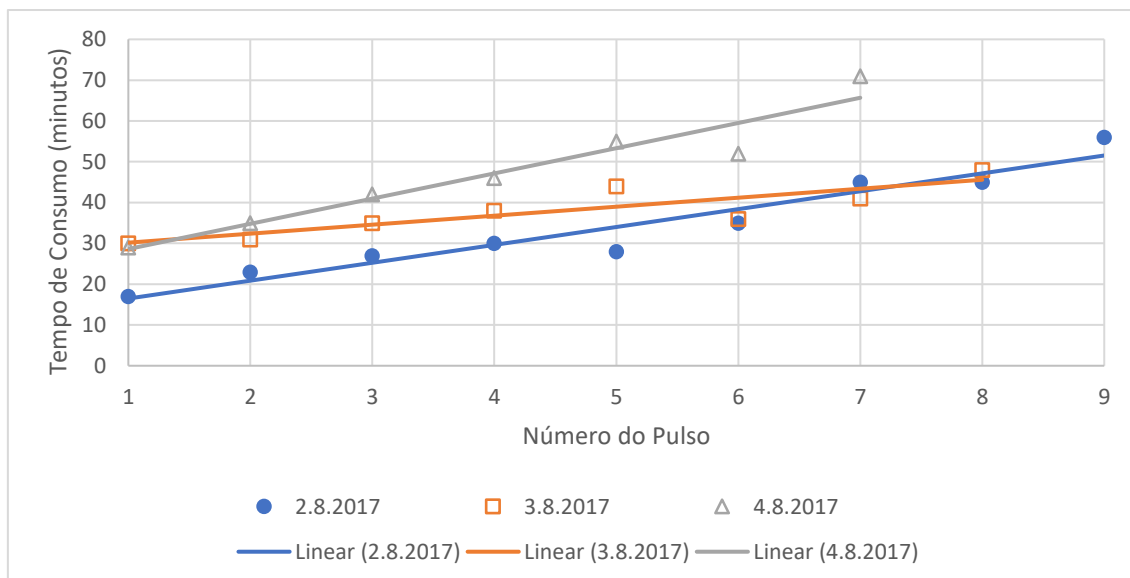


Figura 4.1 - Tempo de consumo dos pulsos dos ensaios preliminares do 1º Algoritmo

Outra conclusão que foi possível retirar da observação dos perfis de pH ao longo de uma acumulação foi que o comportamento do pH entre diferentes pulsos apresenta uma tendência quadrática, ou seja, ao ser feito um ajuste quadrático dos valores obtidos entre pulsos obtemos uma regressão com erro quase desprezável. Assim, foi possível efetuar esse mesmo ajuste entre cada pulso dado nos ensaios efetuados, segundo a Equação 9, e, não só, comparar as diferentes regressões obtidas nos mesmos, como também analisar a progressão dos parâmetros de regressão ao longo de uma acumulação.

$$y = A + Bx + Cx^2$$

Equação 9 – Fórmula da regressão quadrática

Na Tabela 4.4 está representado um resumo dos parâmetros da regressão quadrática efetuada, onde se calculou a média e o desvio padrão do valor de cada um dos parâmetros em cada pulso dado. É observável que o desvio padrão, na maioria dos casos, representa um valor baixo, quase sempre numa ordem de grandeza inferior ao valor da média, validando o facto de que os parâmetros são comparáveis nas diferentes acumulações. Consegue-se observar, também, que o parâmetro A permanece praticamente constante ao longo do tempo, enquanto os parâmetros B e C parecem demonstrar alguma variação.

Observa-se que tanto o parâmetro B como o C parecem aproximar-se do valor 0. Obtendo esta informação em tempo real poderá ser possível estimar o momento para o fim de uma acumulação colocando um valor mínimo no caso do parâmetro B ou um valor máximo, no caso do parâmetro C.

Tabela 4.4 - Média e Desvio Padrão dos parâmetros de regressão quadrática aplicada aos sinais de pH entre pulsos

Parâmetro		1	2	3	4	5	6	7
A	Média	7.2	7.3	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4
	Desvio Padrão	0.21	0.06	0.26	0.13	0.19	0.18	0.19
B	Média	1.5E-03	1.2E-03	9.8E-04	8.7E-04	8.1E-04	8.1E-04	6.9E-04
	Desvio Padrão	2.6E-04	2.2E-04	1.6E-04	1.7E-04	2.4E-04	1.6E-04	1.7E-04
C	Média	-4.4E-07	-3.6E-07	-2.5E-07	-1.9E-07	-1.7E-07	-1.6E-07	-1.2E-07
	Desvio Padrão	4.8E-08	9.9E-08	8.6E-08	8.3E-08	9.9E-08	5.5E-08	5.0E-08

4.1.2 2º Algoritmo: Controlo *On/Off* por *setpoint* de DO e declive

Realizaram-se quatro ensaios utilizando como controlo da alimentação de substrato o 2º algoritmo. As condições e parâmetros aplicados estão representados na Tabela 4.5.

Tabela 4.5 - Resumo das condições de operação e dos parâmetros utilizados nos ensaios do 2º algoritmo

Data	Volume de Biomassa + Água (mL)	Volume do Pulso (mL)	DO inicial	D _{sp}	DO _{sp}
25.7.2017	300	38	84%	0.27	55%
26.7.2017	300	75	84%	0.1	55%
27.7.2017	300	38	79%	0.1	55%
28.7.2017	300	19	80%	0.07	55%

De forma análoga à do 1º algoritmo tentou-se avaliar o desempenho do 2º algoritmo e avaliar os perfis ao longo de cada acumulação tentando retirar algumas relações que pudessem auxiliar à otimização deste método de controlo.

Análise dos Perfis de DO Obtidos

Em relação ao tempo de consumo dos pulsos dados, Figura 4.2, é possível concluir que, tal como ocorreu nos ensaios preliminares do 1º Algoritmo, este, na maior parte dos casos, aumenta com o decorrer da acumulação.

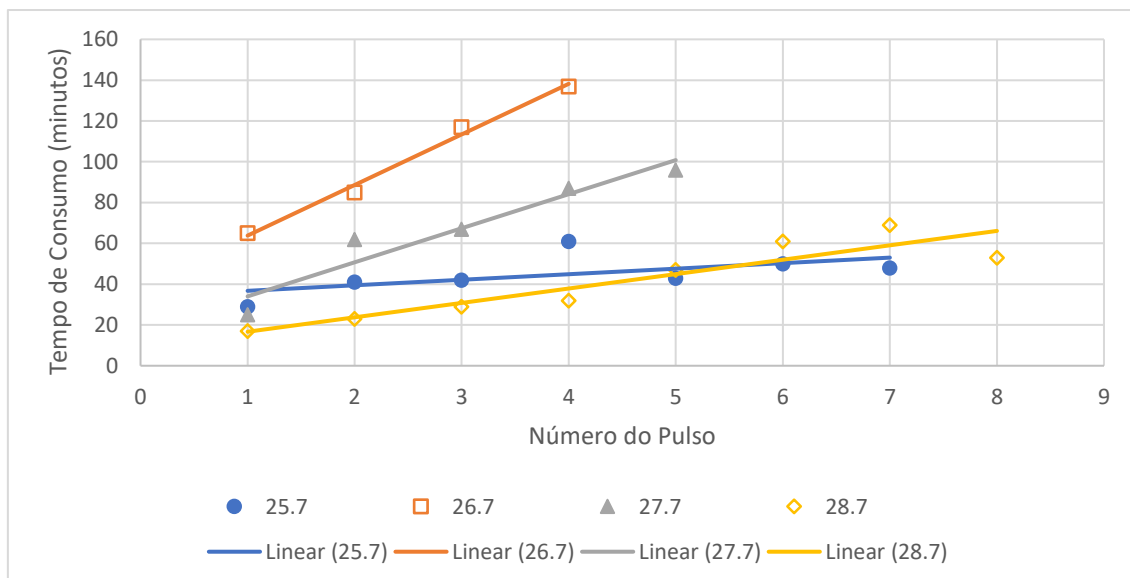


Figura 4.2 - Tempo de consumo dos pulsos nos ensaios preliminares do 2º Algoritmo

Na Tabela 4.6 estão representados os resultados de validação do 2º algoritmo onde em 22 dos 24 pulsos adicionados a alimentação foi feita de forma autónoma quando os parâmetros de controlo foram cumpridos. Podemos, assim, concluir que, a nível de programação, o algoritmo se encontra funcional e pronto para os testes de produção à escala piloto.

Tabela 4.6 - Resultados de validação do 2º algoritmo

Data	Volume Final (mL)	Número de Pulsos	Número de Pulsos Automáticos	Tempo de Ensaio (horas)
25.7.2017	566	7	7	5,23
26.7.2017	600	4	3	5,45
27.7.2017	490	5	5	5,62
28.7.2017	452	8	7	5,52

Estudando ao pormenor os dois casos em que a alimentação automática não funcionou percebe-se que tal aconteceu porque o parâmetro D_{sp} não foi cumprido. Observando a progressão do mesmo à medida que o tempo de acumulação avança, representado na Figura 4.3, conclui-se que existe um decaimento quase linear do valor do declive que, nos casos mais extremos, pode levar a uma falha na alimentação continua pretendida. Essa situação ocorreu nos ensaios dos dias 26.7 e 28.7 onde, em ambos os casos, o valor do declive no último pulso foi inferior ao *setpoint* estabelecido.

Assim, pode-se concluir que para efetuar os ensaios de produção utilizando este tipo de algoritmo é necessário ter atenção à atribuição do valor de D_{sp} . Por segurança estabeleceu-se que este não deve ser superior a 0,01.

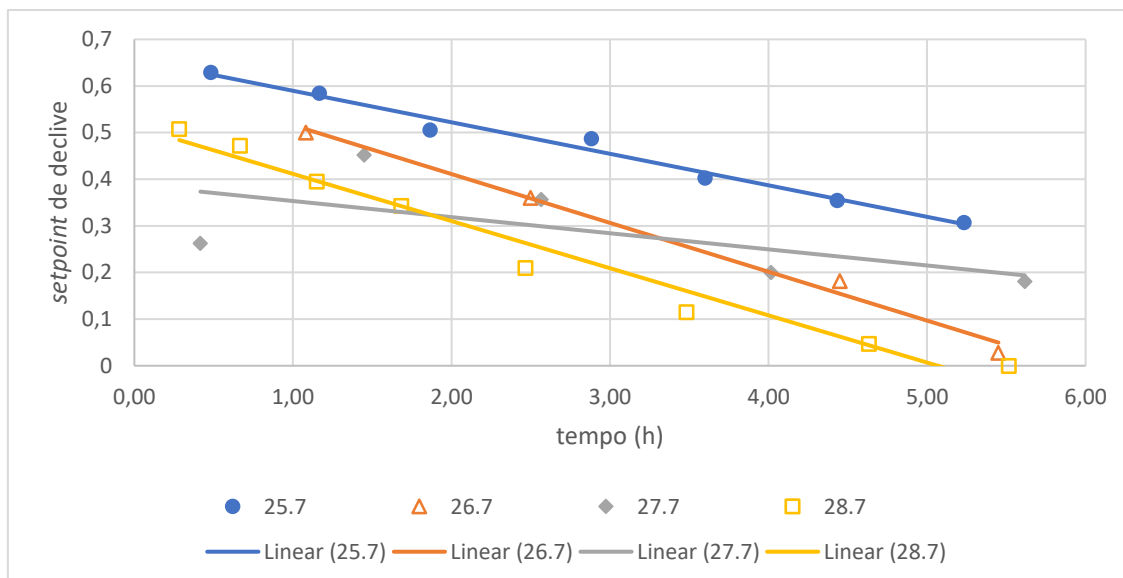


Figura 4.3 - Progressão do parâmetro D_{sp}

Em relação ao segundo parâmetro do algoritmo, que tem de ser cumprido para existir alimentação automática, DO_{sp} , não se conseguiram tirar muitas conclusões. Ainda assim, notou-se que o valor de DO mínimo, atingido após a adição de um novo pulso, sofria um ligeiro aumento com o decorrer da acumulação, alertando para o facto de que, se o valor de *setpoint* atribuído for demasiado baixo, o algoritmo pode entrar num *loop* de alimentação quase contínua.

4.2 Ensaios de Produção à Escala Piloto

Neste subcapítulo vão ser abordados os resultados obtidos nos ensaios de produção à escala piloto realizados nos meses de novembro e dezembro. Serão apresentados valores que permitem avaliar o desempenho prático dos algoritmos estudados como a quantidade de PHA gerada, a concentração de VFA não consumidos, as produtividades volumétricas e específicas, entre outros. No final será feita uma comparação entre todos os ensaios de forma a averiguar os que apresentam melhor rentabilidade.

Como o objetivo principal desta dissertação é a acumulação de PHA feita de forma eficiente tentar-se-á, ainda, averiguar qual a metodologia que permitirá atingir a produção de PHA anual mais elevada, tendo em consideração as condições de operação e o tempo total do processo.

Nesta fase é importante frisar que se tinha como objetivo fazer uma avaliação detalhada às velocidades de consumo dos VFA entre pulsos, mas tal não foi possível pela limitação de tratamento das amostras retiradas. Na análise de resultados que se segue optou-se por dar principal foco à quantidade de ácidos não consumidos no final do processo.

Nestes ensaios foram testados os dois primeiros algoritmos descritos no subcapítulo 3.2. Para cada um foram efetuados cinco ensaios fazendo alterar o volume dos pulsos e os principais parâmetros de controlo de cada algoritmo, o *setpoint* do pH e o *setpoint* do DO. Na Tabela 4.7 está representado um resumo dos ensaios e condições de operação aplicadas.

Tabela 4.7 - Resumo das condições de operação dos ensaios de produção

Ensaio nº	Data	Parâmetro Monitorizado	Parâmetro(s) de Controlo	Tempo Total (horas)	Volume Inicial (L)	Volume por pulso (L)	Volume Total dos Pulsos (L)	Volume final (L)	Biomassa Ativa (g/L)	pH do Substrato
DO 1	17.11	DO	DOsp=75% Dsp=0.01	6,37	33	4,4	22	55	2,4	4,7
DO 2	20.11	DO	DOsp=50% Dsp=0.01	-		2,2	-	-	-	
DO 3	22.11	DO	DOsp=45% Dsp=0.01	5,02		4,4	18	51	2,24	
DO 4	29.11	DO	DOsp=57% Dsp=0.01	4,40		2,2	13	46	3,13	
DO 5	30.11	DO	DOsp=60% Dsp=0.01	5,37		2,2	27	60	2,58	
pH 1	4.12	pH	pHsp=9,60	7,13		4,4	22	55	2,35	
pH 2	6.12	pH	pHsp=9,40	4,58		1,1	15	48	2,24	
pH 3	13.12	pH	pHsp=9,40	5,27		Misto	22	55	3,62	
pH 4	14.12	pH	pHsp=9,45	6,07		1,1	25	58	4,19	
pH 5	28.12	pH	pHsp=9,30	5,85		2,2	20	53	2,63	

De forma a tentar manter as condições iniciais entre ensaios o mais estáveis possível tentou-se que, tanto a biomassa ativa, como a carga orgânica alimentada ao reator de seleção permanecessem constantes neste período. Tendo em conta que o substrato proveniente do reator de digestão anaeróbia apresenta alguma variabilidade, esta tarefa pode não ser fácil de atingir, contudo não se notaram grandes variações na composição e na sua concentração. Ainda assim, é perceptível que a concentração celular no reator de acumulação apresenta alguma variação. Tratando-se de um processo de produção através de MMC e utilizando um substrato complexo, essa variação seria de esperar.

É importante referir que as acumulações terminaram por limitação de tempo ou de volume do reator, pelo que o potencial de acumulação máximo da cultura nunca foi atingido.

4.2.1 1º Algoritmo: Descrição dos Ensaios

Neste subcapítulo será feita uma descrição detalhada dos ensaios realizados utilizando como método de controlo da alimentação o 1º algoritmo: controlo por *setpoint* de pH. Como dito anteriormente estes ensaios realizaram-se entre os dias 4 e 28 de dezembro de 2017.

Os valores de pH_{sp} foram definidos tendo em conta o valor de pH inicial em cada ensaio. Comparando com os ensaios preliminares é possível concluir que o perfil de pH se comportou de forma diferente sendo que, nestes ensaios, após a adição do primeiro pulso o valor de pH rapidamente recuperava para o valor de pH inicial, indicando que o pH_{sp} deveria ser um valor superior, contrariamente ao observado à escala laboratorial. Este comportamento corrobora o que foi dito anteriormente em relação à influência que

o reator de seleção tem nesta última fase do processo, pois a sintonização do controlador depende da forma como a cultura irá reagir aos estímulos.

Relativamente ao substrato utilizado neste grupo de ensaios, podemos observar na Tabela 4.8 que a sua concentração não permaneceu constante, algo que influencia os resultados de cada acumulação e dificulta a comparação entre valores de diferentes acumulações.

Tabela 4.8 - Resumo dos volumes e quantidades adicionadas de substrato

Nº do Ensaio	Volume Adicionado (L)	gCQO
6	22	433
7	26	411
8	22	480
9	22	515
10	20	415

Ensaio de 4 de dezembro – pH 1

Na Figura 4.4 está representado o perfil de pH obtido no ensaio de 4 de dezembro. Observa-se algum ruído no sinal, que se manifesta pela oscilação do sinal à volta do valor de pH real. Torna-se explícita a necessidade de utilizar um valor médio de alguns pontos para evitar que uma oscilação no sinal complique a ação do programa no que toca ao método de controlo automático.

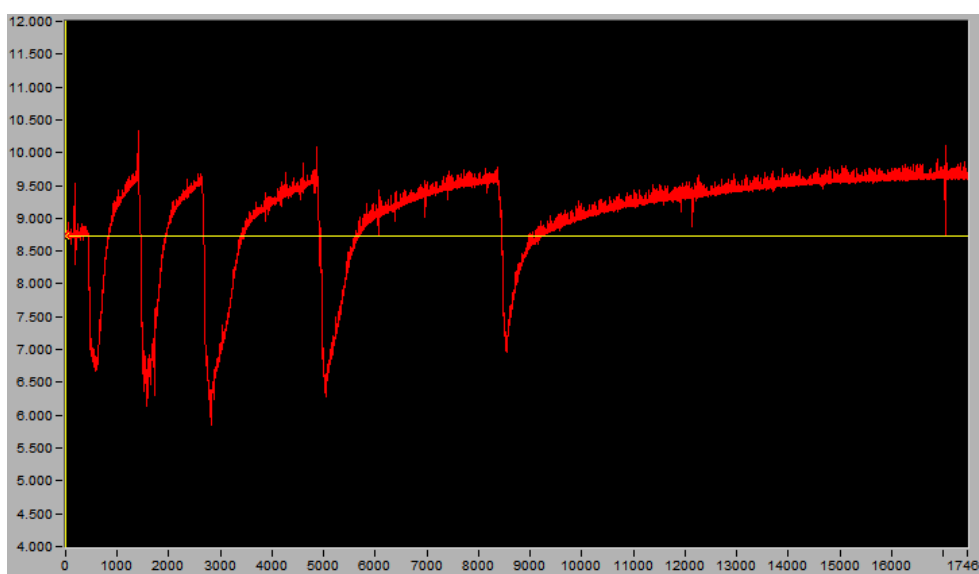


Figura 4.4 - Perfil de pH obtido no ensaio pH 1

Este foi o primeiro ensaio realizado com o objetivo de avaliar o desempenho do algoritmo de controlo da alimentação com *setpoint* do pH. O volume de cada pulso (V_{pulso}) foi definido como sendo equivalente ao volume alimentado num ciclo do reator de seleção ($V_{\text{ciclo(SBR)}}$) e foi calculado de acordo com a Equação 10.

$$V_{pulso} = \frac{V_{purga} \times V_{ciclo (SBR)}}{V_{SBR}} = \frac{25 L \times 17,58 L}{100 L} = 4,4 L$$

Equação 10 - Cálculo do volume de um pulso equivalente a 1 ciclo do SBR

Definido o volume necessário de alimentar por pulso, calculou-se então o tempo que a bomba deveria ser ativada de forma a serem alimentados 4,4 L. Para tal, utilizaram-se os valores de calibração da bomba e o volume do pulso, segundo a Equação 11.

$$T_{Bomba Ligada} = \frac{V_{pulso} \times T_{calibração}}{V_{calibração}} = \frac{4,4 L \times 69 s}{1 L} = 303,6 s$$

Equação 11 - Cálculo do tempo de bomba ligada de um pulso equivalente a 1 ciclo do SBR

Foi utilizada a capacidade de débito máxima da bomba e, apesar disso, o tempo de bomba ligada utilizado neste caso foi de cerca de 5 minutos. Como se definiu que as amostras após o pulso seriam tiradas quando a bomba desligasse podemos assumir que, dado o elevado tempo de bomba ligada, quando se retirou a amostra parte dos VFA alimentados já teriam sido consumidos, algo que dificulta o tratamento dos dados posteriormente.

Na Tabela 4.9 estão representados os parâmetros do algoritmo utilizados no início desta acumulação. O número de pontos utilizados para o cálculo da média (N_p , média) foi definido tendo em conta a taxa de aquisição de pontos do programa, que tinha sido estabelecida como 4 pontos por segundo. Assim este parâmetro foi calculado de acordo com a Equação 12.

$$N_{p,média} = taxa_{aquisição programa} \times \Delta t = 4 \frac{pontos}{s} \times 30 s = 120 pontos$$

Equação 12 - Cálculo do parâmetro N_p , média

Tabela 4.9 - Parâmetros aplicados no programa na acumulação pH 1

Parâmetros	Valor
N_p, média	120
$T_{Contador}$ (s)	0
pH_{sp}	9,60
$T_{BombaLigada}$ (s)	303,6
$T_{BombaDesligada}$ (s)	303,6

O tempo de contador foi definido como sendo 0, pois não havia necessidade de aguardar após o início do ciclo de controlo. Já o tempo de bomba desligada utilizado foi igual ao tempo de bomba ligada, pois este valor pareceu ser eficaz para o tempo de consumo entre pulsos esperado.

O pH_{sp} foi definido como 9,60 tendo em conta o valor de pH inicial (pH_i) de 8,76 dando origem a um rácio pH_{sp}/pH_i de 1,09.

Este ensaio, que teve uma duração de 7,13 horas, iniciou-se às 10:23h e terminou às 17:31h. Adicionou-se um total de 5 pulsos, equivalendo a 22 litros. Na Figura 4.5 estão representados os tempos de consumo de cada pulso dado nesta acumulação, bem como a quantidade de PHA por litro de reator. Como seria de esperar, e em concordância com

os ensaios preliminares, este valor aumenta com o avançar do processo, por exemplo, do 1º para o último pulso o tempo de consumo aumento cerca de 9 vezes. Observamos ainda que à medida que a quantidade de polímero aumenta no interior das células o tempo entre pulsos aumenta, essa relação vem confirmar o facto de que a maior influência no tempo de consumo é a quantidade de PHA já acumulada.

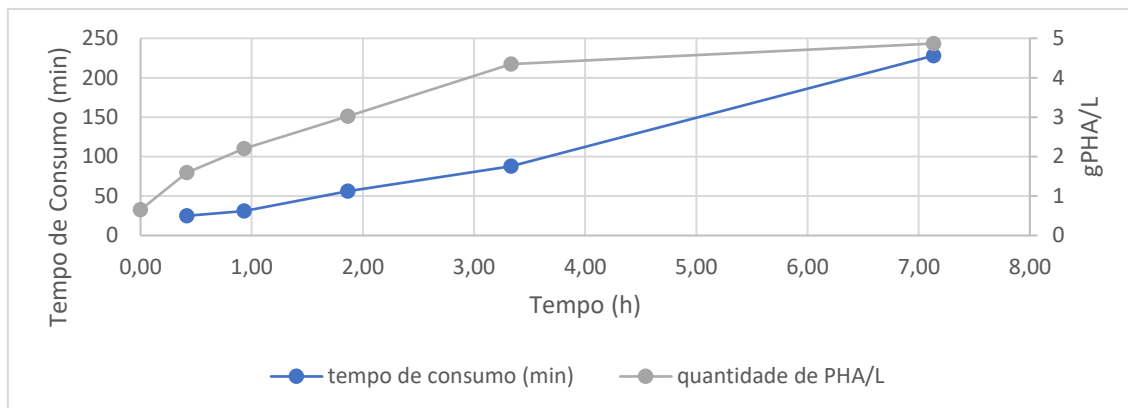


Figura 4.5 - Tempo de consumo dos pulsos e quantidade de PHA por litro de reator do ensaio pH 1

Em relação ao valor de *setpoint* atribuído no início do ensaio ($\text{pH}_{\text{sp}}=9,60$) conclui-se que este foi suficiente para o controlo automático do processo, ou seja, todos os pulsos foram alimentados autonomamente, como é visível na Figura 4.6, todavia, no último pulso, o valor máximo atingido foi aproximadamente igual ao pH_{sp} , o que não garante que se se pretendesse continuar a acumulação, a alimentação automática funcionasse.

Ainda na Figura 4.6 observa-se que o valor mínimo de pH atingido do primeiro para o último pulso aumenta, tal poderá acontecer, pois, as variações no pH do meio podem levar a uma resposta da cultura de maneira a combater essas oscilações. Assim, com o decorrer de uma acumulação é esperado que o valor de pH mínimo aumente gradualmente.

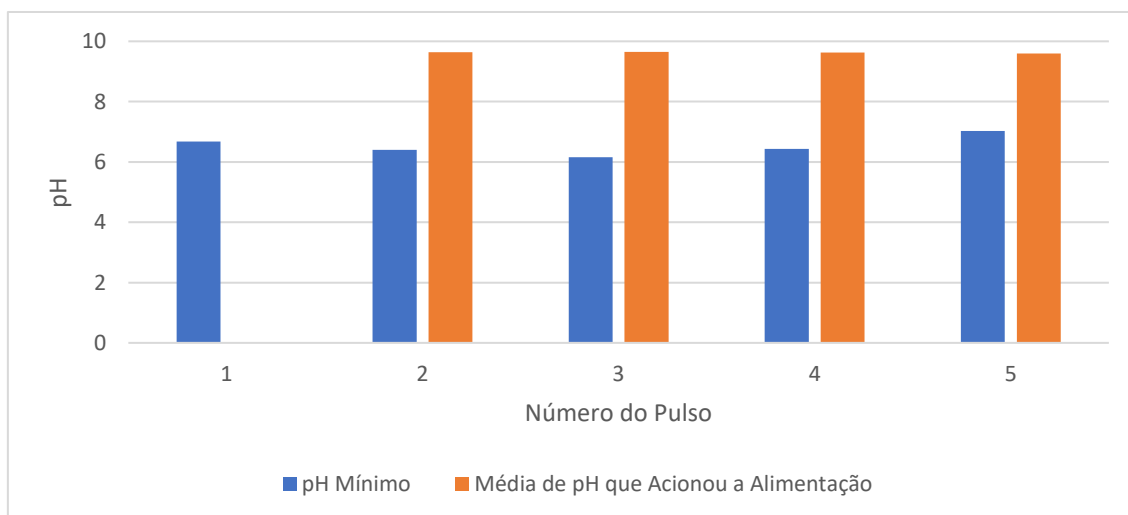


Figura 4.6 - pH mínimo e pH que acionou a alimentação no ensaio pH 1

Após a análise dos tempos de consumo e dos parâmetros de operação seguir-se-á um aprofundamento dos indicadores de rentabilidade deste tipo de processos, começando pela análise do polímero produzido ao longo do tempo de ensaio.

Na Tabela 4.10 são apresentados alguns valores que permitem acompanhar a progressão da produção de PHA neste ensaio. Em primeiro lugar observa-se que antes da introdução do 1º pulso já existiam 21,5 gramas de PHA dentro do reator, isso deve-se ao facto das purgas utilizadas para estes ensaios serem retiradas do reator antes do fim da fase de *famine*. Ainda assim não seria de estranhar que no início de um novo ciclo existissem quantidades vestigiais de PHA na cultura. Em segundo lugar pode-se concluir, com o auxílio da Tabela 4.10 e da Tabela 4.11, que foram produzidas 246,2 gramas de polímero neste processo de acumulação, das quais 79% são constituídas pelo monómero HB e as restantes 21% pelo monómero HV.

Tabela 4.10 - Resumo da quantidade de PHA produzida no ensaio pH 1

Pulso	Tempo Cumulativo (horas)	% Tempo de Acumulação	Quantidade de PHA (g)	% PHA	% de PHA Total Produzido
0	0,00	0%	21,5	22%	0%
1	0,42	6%	59,5	29%	15%
2	0,93	13%	-	-	-
3	1,87	26%	139,7	46%	48%
4	3,33	47%	220	67%	81%
5	7,13	100%	267,7	71%	100%

Em segundo lugar pode-se concluir, com o auxílio da Tabela 4.10 e da Tabela 4.11, que foram produzidas 246,2 gramas de polímero neste processo de acumulação, das quais 79% são constituídas pelo monómero HB e as restantes 21% pelo monómero HV.

Tabela 4.11 - Características do polímero produzido no ensaio pH 1

Quantidade Produzida (g)	% HB	% HV	Quantidade de HB Produzida (g)	Quantidade de HV Produzida (g)
246,2	79%	21%	194,5	51,7

De forma a explicitar a influência da inibição por produto referida anteriormente, tentou-se perceber quais os períodos de produção mais rentáveis e a partir de que momento o ritmo abrandou. Observando, novamente, a Tabela 4.10 conclui-se que com apenas 26% do tempo total de acumulação decorrido, cerca de 1 hora e 52 minutos, já tinham sido produzidas 140 gramas de PHA, ou seja, quase metade de todo o polímero produzido e que ao fim de 47% do tempo, cerca de 3 horas e 20 minutos, tinha sido produzido 81% do total. Tendo em conta estes fatores é seguro afirmar que o momento ideal para terminar esta acumulação teria sido antes da introdução do 5º pulso, pois para além da grande fatia de produção já estar feita, a percentagem de PHA nas células já tinha atingido um valor para o qual o processo de extração seria rentável ⁶¹⁻⁶⁴.

Procedeu-se, ainda, ao cálculo das produtividades volumétricas e específicas do processo. Estes parâmetros permitem ter uma noção mais abrangente do desempenho conseguido numa acumulação pois, para além, de terem em conta a quantidade

produzida e o tempo, têm também em consideração o volume e a concentração celular, respetivamente. Tendo presente que nos diferentes ensaios não se conseguiu manter totalmente a estabilidade das condições de operação, torna-se importante conseguir normalizar os valores obtidos de forma a puderem ser comparáveis.

Na Tabela 4.12 estão representados os cálculos dos resultados obtidos do cálculo das produtividades volumétricas. Calcularam-se produtividades entre cada pulso e uma produtividade média de toda a acumulação segundo a Equação 4 e a Equação 5, respetivamente. Mais uma vez é observável que o ritmo de acumulação abranda significativamente com o passar do tempo, nota-se que a produtividade volumétrica do último pulso é 10 vezes inferior à produtividade volumétrica máxima, que se registou no 1º pulso, assim no 5º pulso o valor da produtividade volumétrica equivalia a apenas 9% da produtividade máxima, enquanto que no 4º pulso esse valor ainda correspondia a 44% do valor máximo. De forma a visualizar este abrandamento, fazendo a derivada da quantidade de PHA por litro de reator, representada na Figura 4.5, obtém-se a produtividade volumétrica no momento.

Tabela 4.12 - Produtividades volumétricas do ensaio pH 1

Pulso	Tempo de Consumo (horas)	PHA Produzido	Produtividade Volumétrica (gPHA/L.h)	Produtividade Volumétrica Média (gPHA/L.h)
1	0,42	38	2,44	0,63
2	0,52	-	-	
3	0,93	118	-	
4	1,47	199	1,08	
5	3,80	246	0,23	

Efetou-se um estudo de forma a perceber qual seria a capacidade de produção anual dos ensaios realizados. Utilizou-se uma base de 350 dias e um volume de reator de 60. Considerando as 24 horas diárias estimou-se o número de *batch* máximos diários. Tendo em conta que a duração deste ensaio foi de 7,13 horas, chegou-se ao valor de 3,4 *batch* por dia. Assim, com a produtividade volumétrica média deste ensaio, chegou-se ao valor máximo de 318 kg por ano.

De forma a se conseguir perceber qual a reação da cultura a este tipo de alimentação foram calculadas produtividades específicas entre pulsos e a produtividade específica média, utilizando a Equação 6 e a Equação 7, respetivamente. Na Tabela 4.13 estão representados os resultados obtidos desses cálculos. Este parâmetro devolve a quantidade de PHA produzido, por quantidade de biomassa ativa por hora. Neste ensaio a produtividade específica média foi de 0,34 gPHA por grama de biomassa ativa por hora e a produtividade específica máxima foi 7,5 vezes superior à produtividade específica final.

Tabela 4.13 - Produtividades Específicas do ensaio pH 1

Pulso	Produtividade Específica (gPHA/gXA.h)	Produtividade Específica Média (gPHA/gXA.h)
1	0,9	0,34
2	-	
3	-	
4	0,54	
5	0,12	

Depois de analisados os dados de quantificação de PHA produzido e produtividades deste ensaio foi feito um estudo aos perfis de ácidos. Na Tabela 4.14 estão representados alguns parâmetros essenciais para a análise que se segue. Como já foi referido anteriormente, neste ensaio adicionaram-se 5 pulsos de 4,4 L, portanto, foram adicionados no total 22 L.

Tabela 4.14 - Concentração do substrato utilizado e volumes adicionados no ensaio pH 1

Concentração (gCQO/L)	Volume de Pulso (L)	Volume Adicionado (L)	Quantidade Adicionada (gCQO)
19,7	4,4	22	433,4

A composição do substrato alimentado neste ensaio está representada na Tabela 4.15, onde se consegue perceber que o VFA adicionado em maior quantidade é o Ácido Butírico, que representa 59% do total dos VFA adicionados, o que explica em parte a maior percentagem do monómero HB no polímero final.

Tabela 4.15 - Composição do substrato utilizado no ensaio pH 1

Ácido Láctico	Ácido Acético	Ácido Propiónico	Etanol	Ácido Butírico	Ácido Valérico
0%	24%	4%	9%	59%	4%

Na Figura 4.7 estão representadas tanto as quantidades de VFA adicionadas no total como as quantidades consumidas. É possível perceber que existiu uma grande acumulação de VFA neste ensaio com apenas 69% dos ácidos alimentados a serem consumidos pela cultura. Este facto poderá querer dizer que o valor de *setpoint* selecionado no início do processo foi demasiado baixo e não deu tempo suficiente à cultura para consumir todos os ácidos que eram alimentados em cada pulso fazendo com que estes se fossem acumulando dentro do reator.

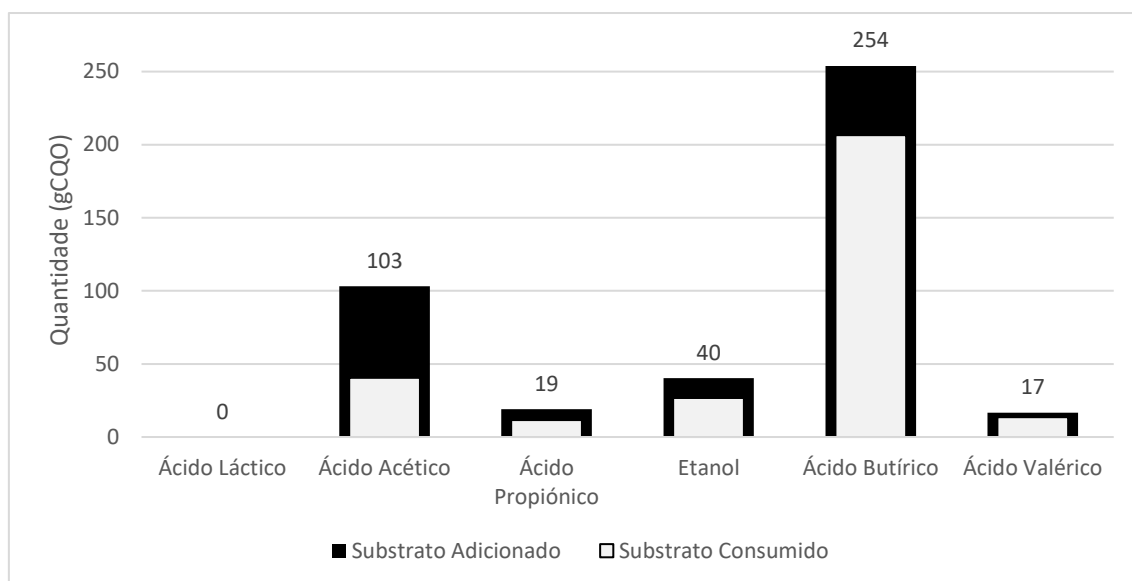


Figura 4.7 - Quantidade de VFA adicionada e consumida no ensaio pH 1

Os ácidos que foram consumidos em maior percentagem foram o ácido butírico e o valérico, com um consumo de 81% e 82% da quantidade adicionada, respetivamente. Para este tipo de culturas a síntese de PHA através destes ácidos é a forma mais direta de obterem a fonte de energia que necessitam, assim será normal que estes sejam consumidos preferencialmente, ainda assim posteriormente serão apresentados casos em que isto não acontece tão linearmente.

Para terminar, foi efetuado o cálculo das velocidades de consumo médias dos ácidos adicionados neste ensaio, representadas na Tabela 4.16. Neste caso é perceptível que o VFA consumido com maior velocidade foi o ácido butírico apresentando um valor de velocidade de consumo média consideravelmente superior aos restantes ácidos, 3,5 vezes superior à média das velocidades de consumo de todos os VFA. Observa-se também que o ácido valérico não possui uma velocidade de consumo média muito elevada, representa apenas 23% da média das velocidades de todos VFA, no entanto esse facto pode-se dever à concentração deste dentro do reator, que é pequena quando comparada à dos outros ácidos, com a exceção do ácido propiónico. Como já foi referido anteriormente e de acordo com a equação de *Michaelis-Menten*, a concentração dos ácidos dentro do reator afeta diretamente a velocidade de consumo dos mesmos. Podemos observar na Figura 4.7 que, por exemplo, da quantidade total de ácido acético adicionado neste ensaio, apenas 36% foi consumido e, ainda assim este apresenta uma velocidade de consumo média superior à do ácido valérico.

Tabela 4.16 - Velocidades de Consumo Médias dos VFA adicionados no ensaio pH 1

VFA	Ácido Láctico	Ácido Acético	Ácido Propiónico	Etanol	Ácido Butírico	Ácido Valérico
Velocidade de Consumo Média (gCQO/h)	0,00	5,68	1,63	3,76	28,95	1,89

Ensaio de 6 de dezembro – pH 2

Inicia-se a descrição do ensaio de 6 de dezembro com a Figura 4.8, onde está representada uma parte do sinal de pH obtido no programa. De notar que este perfil não corresponde ao tempo total da acumulação.

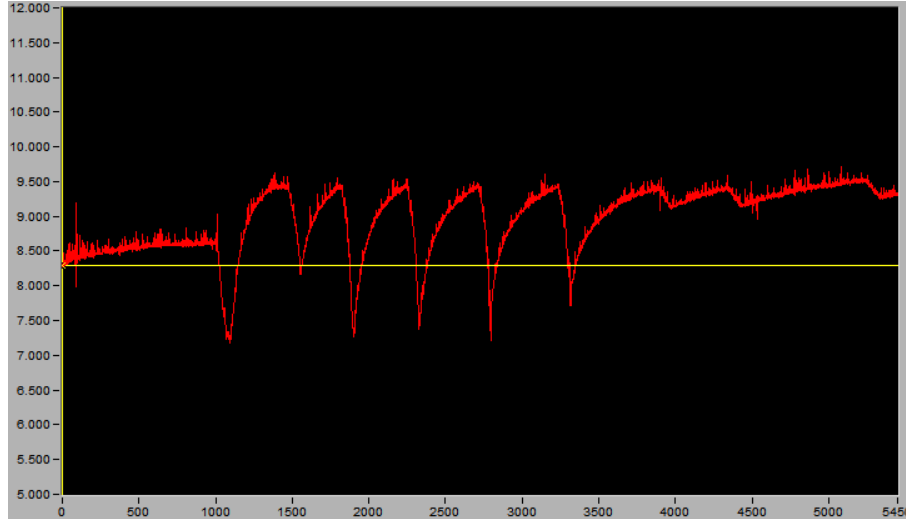


Figura 4.8 - Perfil de pH obtido no ensaio pH 2

Este foi o segundo ensaio realizado com o objetivo de avaliar o desempenho do algoritmo de controlo da alimentação com *setpoint* do pH. Neste ensaio o volume de cada pulso foi definido como sendo equivalente a um quarto do volume alimentado num ciclo do reator de seleção (SBR) e foi calculado de acordo com a Equação 13.

$$V_{pulso} = \frac{1}{4} \times \frac{V_{purga} \times V_{ciclo (SBR)}}{V_{SBR}} = \frac{1}{4} \times \frac{25 L \times 17,58 L}{100 L} = 1,1 L$$

Equação 13 - Cálculo do Volume de um pulso equivalente a $\frac{1}{4}$ do ciclo do SBR

Tendo em conta que o volume do pulso mudou, em relação ao ensaio anterior tornou-se necessário recalcular o valor do parâmetro $T_{BombaLigada}$. Utilizou-se novamente a Equação 14.

$$T_{Bomba Ligada} = \frac{V_{pulso} \times t_{calibração}}{V_{calibração}} = \frac{1,1 L \times 69 s}{1 L} = 75,9 s$$

Equação 14 - Cálculo do tempo de bomba ligada de um pulso equivalente a $\frac{1}{4}$ do ciclo do SBR

Na Tabela 4.17 estão representados os parâmetros aplicados no programa no processo pH 2. Em relação aos parâmetros N_p , média e $T_{contador}$, optou-se por mantê-los iguais aos do ensaio anterior e estes permaneceram iguais nos restantes ensaios. Já o valor de pH_{sp} , neste caso foi estimado utilizando o rácio pH_{sp}/pH_i obtido anteriormente, de acordo com a Equação 15.

$$pH_{sp} = pH_i \times \text{rácio} \frac{pH_{sp}}{pH_i} = 8,612 \times 1,09 = 9,40$$

Equação 15 - Cálculo do pH setpoint do ensaio pH 2

O valor de $T_{BombaDesligada}$, analogamente ao ensaio pH 1, foi introduzido como igual ao $T_{BombaLigada}$.

Tabela 4.17 - Parâmetros aplicados no programa na acumulação pH 2

Parâmetros	Valor
Np, média	120
T_{Contador} (s)	0
pH_{sp}	9,40
T_{BombaLigada} (s)	75,9
T_{BombaDesligada} (s)	75,9

Este ensaio começou às 10:30h e terminou às 15:31h tendo durado 4,58 horas. Adicionou-se um total de 14 pulsos, equivalendo a 15,4 litros. Na Figura 4.9 estão representados os tempos de consumo de cada pulso dado nesta acumulação, bem como a quantidade de PHA por litro de reator. Mais uma vez, como seria de esperar, e em concordância com os ensaios preliminares e com o ensaio pH 1, o valor do tempo de consumo dos pulsos aumenta com o avançar do processo e com a progressão da quantidade de polímero já armazenada, ainda assim é perceptível que esta subida não ocorre de forma tão acentuada como no ensaio anterior. Isto deve-se ao facto de que o volume dos pulsos, neste caso, equivale a ¼ do utilizado anteriormente.

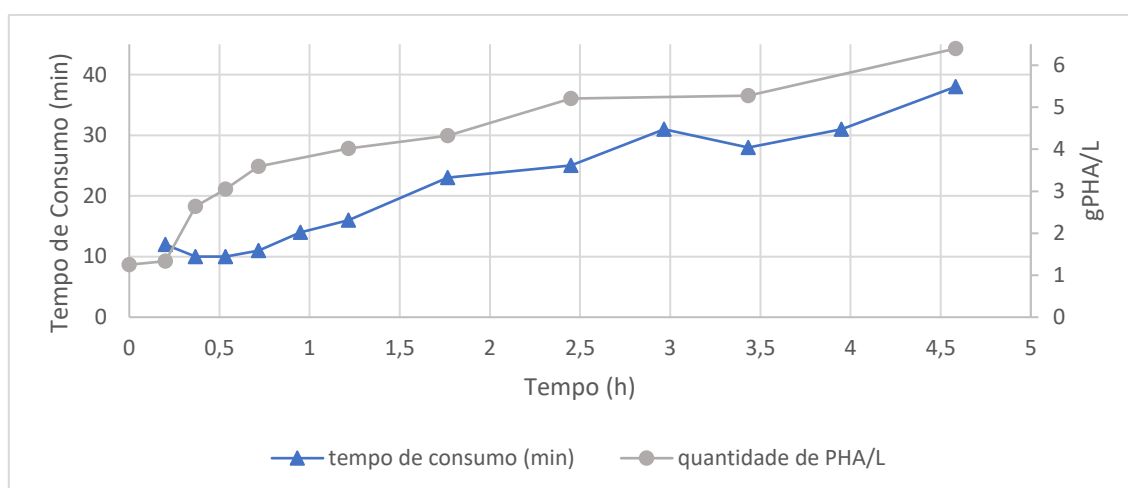


Figura 4.9 - Tempo de consumo dos pulsos e quantidade de PHA por litro de reator do ensaio pH 2

Em relação ao valor de *setpoint* atribuído no início do ensaio (pH_{sp}=9,40) conclui-se que não foi suficientemente eficaz a nível de automação do processo. Na Figura 4.10 estão representados os valores de pH mínimo e os valores de média do pH no momento da adição de um pulso.

No 10º pulso o valor de pH começou a estabilizar à volta dos 9,3 por isso, alterou-se o pH_{sp} para esse mesmo valor. Todavia, este valor só foi capaz de acionar mais um pulso automático, logo, no 12º pulso, alterou-se novamente o *setpoint* para 9,25 sendo que este se manteve até ao final do processo.

Tendo em conta que para continuar o ensaio por mais tempo seria necessário alterar muitas vezes o parâmetro de controlo da alimentação optou-se por parar a acumulação mais cedo. Este problema demonstra uma das fragilidades deste algoritmo de controlo, onde a atribuição do valor de pH_{sp} é crucial para o bom funcionamento e mesmo que bem ponderado este valor pode não ser suficiente para durar todo um processo de

produção. Aqui coloca-se também outro problema. Se o utilizador pretender ter a certeza que o valor de *setpoint* vai ser suficiente para todo o ensaio poderá optar por escolher um valor muito baixo em relação ao pH inicial, contudo, nesse caso poderá existir uma alimentação muito precipitada que não deixa tempo suficiente para a cultura consumir os ácidos previamente alimentados, o que levará a uma grande acumulação de ácidos do reator que, por sua vez reduz o rendimento do processo e, em casos mais extremos, pode levar a uma inibição por excesso de substrato.

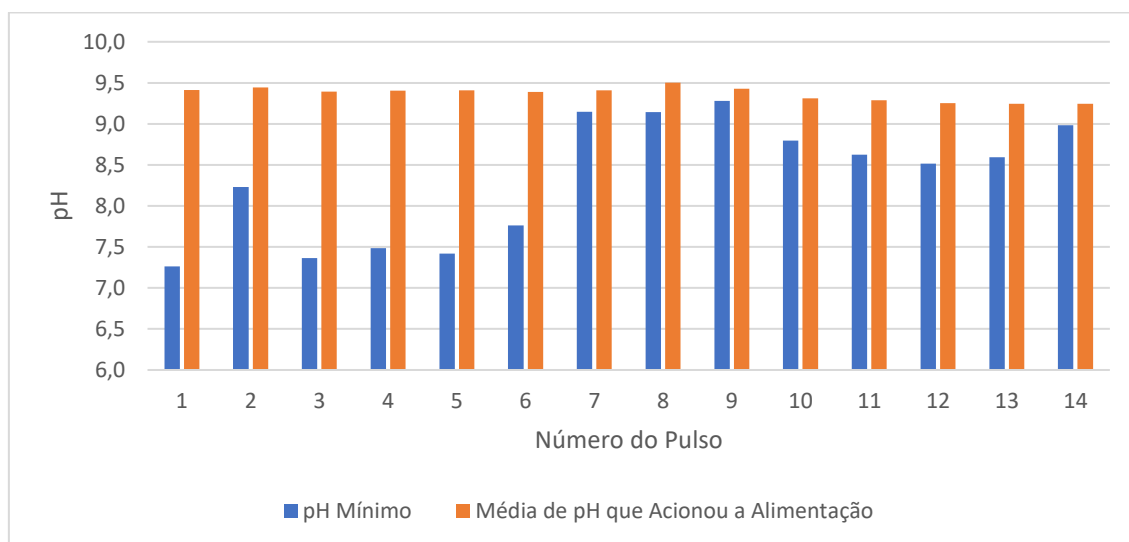


Figura 4.10 - pH mínimo e pH que acionou a alimentação no ensaio pH 2

Ainda na Figura 4.10 consegue-se observar a progressão do pH mínimo atingido por cada pulso dado e, mais uma vez, nota-se uma tendência para que este vá aumentando ao longo do tempo. É possível, também, identificar que em 3 dos 14 pulsos o valor mínimo atingido saiu do esperado. Nos pulsos 7,8 e 9 o valor mínimo foi superior ao esperado fazendo com que estes valores saiam um pouco da tendência observada. Esse facto é explicado por uma anomalia no sistema de alimentação onde, nesses pulsos, existiu um atrofamento da tubagem que alimenta os VFA ao reator fazendo com que o volume desejado de alimentação não fosse cumprido. Assim a oscilação no valor de pH foi inferior ao que era suposto.

Na Tabela 4.18 está representado um resumo dos valores mais relevantes da quantidade de PHA produzida no ensaio pH 2. Observa-se, novamente, que antes da acumulação começar já existia uma certa quantidade de PHA armazenado pela cultura, contudo pode-se afirmar que o valor de %PHA medido na primeira amostra é muito grande levando a pensar que poderá existir algum erro associado à medição do mesmo. Continuando a análise e corroborando o que já havia sido dito em relação ao abrandamento de produção gradual, neste ensaio em apenas 39% do tempo total já tinha sido produzido 52% do polímero obtido no final, sendo atingida nesse momento uma percentagem de 63% de PHA no meio intracelular.

É ainda perceptível que a quantidade de PHA do 12º pulso para o final do processo dá um salto inesperado. Esse valor poderá ser considerado um *outlier* pois sai da tendência esperada.

Tabela 4.18 - Resumo da quantidade de PHA produzida no ensaio pH 2

Pulso	Tempo Cumulativo (horas)	% Tempo de Acumulação	Quantidade de PHA (g)	%PHA	% de PHA Total Produzido
0	0,00	0%	41,3	30%	0%
1	0,20	4%	45,4	35%	2%
2	0,37	8%	93,0	44%	19%
3	0,53	12%	110,6	51%	26%
4	0,72	16%	134,2	54%	35%
6	1,22	27%	159,0	58%	44%
8	1,77	39%	180,8	63%	52%
10	2,45	53%	229,2	67%	70%
12	3,43	75%	243,7	68%	75%
14	4,58	100%	309,6	69%	100%

Em relação às características do polímero produzido neste ensaio, apresentadas na Tabela 4.19, conclui-se que das 268 gramas produzidas no total deste ensaio 80% são compostas pelo monómero HB. Este valor está de acordo com o esperado e com os valores obtidos no ensaio anterior, demonstrando, mais uma vez, que o fator que mais influência as características do polímero final é a composição do substrato alimentado.

Tabela 4.19 - Características do polímero produzido no ensaio pH 2

Quantidade Produzida (g)	% HB	% HV	Quantidade de HB Produzida (g)	Quantidade de HV Produzida (g)
268,3	80%	20%	214,7	53,6

De forma análoga à descrição do ensaio pH 1, após a análise das quantidades e características do polímero produzido foram calculadas as produtividades volumétricas obtidas neste ensaio. Assim, na Tabela 4.20 estão representados os resultados obtidos. Em primeiro lugar, pode-se observar que o valor de produtividade volumétrica no 1º pulso é um valor muito inferior à maioria dos restantes, representa 66% da produtividade média global, o que poderá ser explicado pelo facto de que no início do processo possivelmente existirá uma fase de adaptação a cultura ao novo meio. Outra observação a fazer, antes de serem analisados os dados é que a produtividade volumétrica obtida no último ponto é demasiado elevada, tendo em conta o notório decréscimo progressivo, facto esse explicado pelo elevado valor de TSS obtido no tratamento da última amostra. Assim, para o cálculo da produtividade volumétrica média será desprezado este *outlier*.

Posto isto, consegue-se, novamente, observar que o ritmo de acumulação baixa ao longo do tempo. No 12º pulso o valor da produtividade volumétrica equivalia a apenas 4% da produtividade máxima calculada, ou seja, cerca de 25 vezes inferior.

Tabela 4.20 - Produtividades volumétricas do ensaio pH 2

Pulso	Tempo de Consumo (horas)	PHA Produzido (g)	Produtividade Volumétrica (gPHA/L.h)	Produtividade Volumétrica Média (gPHA/L.h)
1	0,20	4	0,60	0,91
2	0,17	52	8,11	
3	0,17	69	2,91	
4	0,18	93	3,44	
6	0,50	118	1,25	
8	0,55	140	0,95	
10	0,68	188	1,61	
12	0,98	202	0,32	
14	1,15	268	1,18	

Efetuiu-se, novamente, o cálculo da capacidade de produção anual. Para um ensaio com estas características será possível produzir 5,2 *batch* por dia, equivalendo a 459 kg de PHA por ano.

Em relação às produtividades específicas calculadas para este ensaio que estão representadas na Tabela 4.21 consegue-se observar que os valores obtidos por pulso são cerca de 10 vezes superiores aos do ensaio apresentado anteriormente. Tendo em conta que se tentou manter a cultura utilizada, nas experiências desta dissertação, constante, para se obterem resultados comparáveis, será de esperar que os valores de produtividade específica média sejam semelhantes em todos os casos, no entanto será possível existir alguma variação no caso de um método de alimentação ser melhor e evitar qualquer tipo de inibição. A produtividade específica média deste ensaio foi de 0,41 gPHA por g de biomassa ativa por hora e a produtividade específica máxima equivale a 4 vezes a produtividade específica final.

Tabela 4.21 - Produtividades específicas do ensaio pH 2

Pulso	Produtividade Específica (gPHA/gXA.h)	Produtividade Específica Média (gPHA/gXA.h)
1	-	0,41
3	3,13	
5	2,27	
7	0,50	
11	1,03	
14	0,70	

Tal como no ensaio anterior estudou-se o perfil e consumo dos VFA adicionados de forma a perceber se o algoritmo efetuava a alimentação no momento adequado, garantindo que não existia uma grande acumulação de ácidos não consumidos dentro do reator.

Na Tabela 4.22 está representada a concentração do substrato utilizado neste ensaio, bem como a quantidade total adicionada em gCQO. Em comparação com o ensaio pH 1, neste caso introduziu-se uma menor quantidade de VFA e, tendo em conta que a quantidade produzida, neste caso, foi superior podemos à partida assumir que o substrato foi melhor aproveitado, algo que será comprovado posteriormente.

Tabela 4.22 - Concentração do substrato utilizado e volumes adicionados no ensaio pH 2

Concentração (gCQO/L)	Volume de Pulso (L)	Volume Adicionado (L)	Quantidade Adicionada (gCQO)
26,7	1,1	15,4	411,2

Em relação à composição do substrato, representado na Tabela 4.23, observa-se que é idêntico ao do ensaio anterior, ou seja, nesta comparação mantêm-se as composições, mas muda a concentração.

Tabela 4.23 - Composição do substrato utilizado no ensaio pH 2

Ácido Láctico	Ácido Acético	Ácido Propiónico	Etanol	Ácido Butírico	Ácido Valérico
0%	24%	4%	9%	59%	4%

Observando a Figura 4.11 torna-se perceptível que, neste ensaio, a relação entre a quantidade de ácidos adicionados e a quantidade que foi realmente consumida foi muito superior à do ensaio anterior. Dos ácidos adicionados 83% foram utilizados pela cultura, facto esse que representa uma melhoria de 14% em relação ao ensaio pH 1.

Novamente, observa-se que o ácido butírico e o ácido valérico foram os ácidos consumidos preferencialmente. Do total adicionado, 97% do ácido butírico e 96% do ácido valérico foram consumidos, podendo-se afirmar que, em relação a estes ácidos o aproveitamento foi quase total.

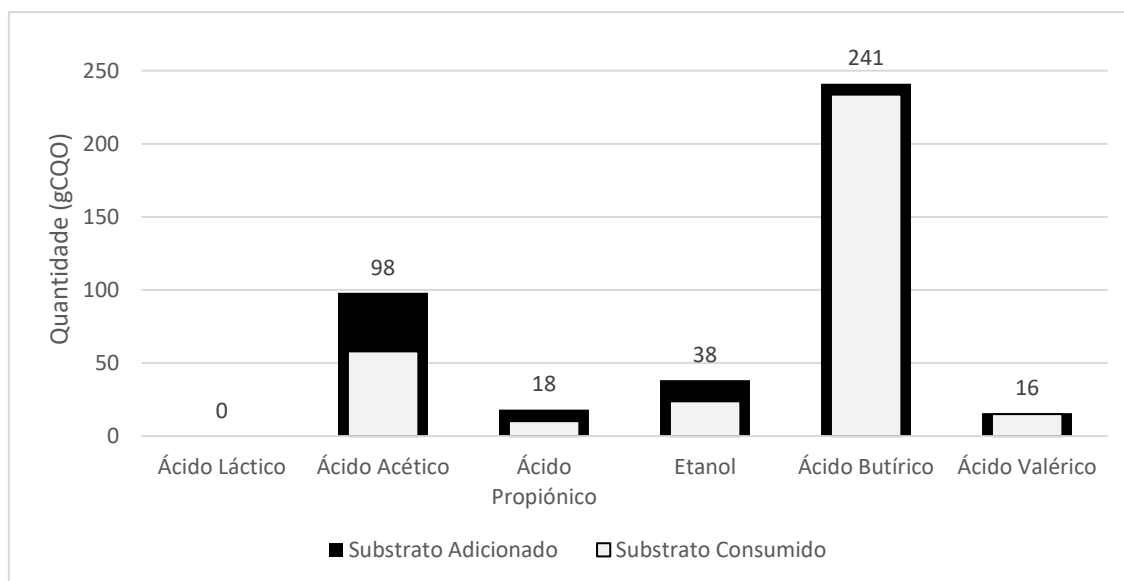


Figura 4.11 - Quantidade de VFA adicionada e consumida no ensaio pH 2

Na Tabela 4.24 estão representadas as velocidades de consumo médias para cada VFA alimentado ao longo deste processo. Consegue-se concluir que as velocidades observadas neste ensaio são superiores às obtidas no ensaio anterior. Esse facto é explicado por ter sido consumida maior quantidade de VFA no ensaio pH 2 em menor tempo, provando que neste caso se obteve um processo mais rentável.

Tabela 4.24 - Velocidades de Consumo Médias dos VFA adicionados no ensaio pH 2

VFA	Ácido Lático	Ácido Acético	Ácido Propiónico	Etanol	Ácido Butírico	Ácido Valérico
Velocidade de Consumo Média (gCQO/h)	0,00	12,7	2,25	5,21	51,0	3,29

Ensaio de 13 de dezembro – pH 3

Na Figura 4.12 está representada uma parte do perfil da acumulação do dia 13 de dezembro. Mais uma vez é importante referir que nessa figura não está representado o sinal obtido completo.

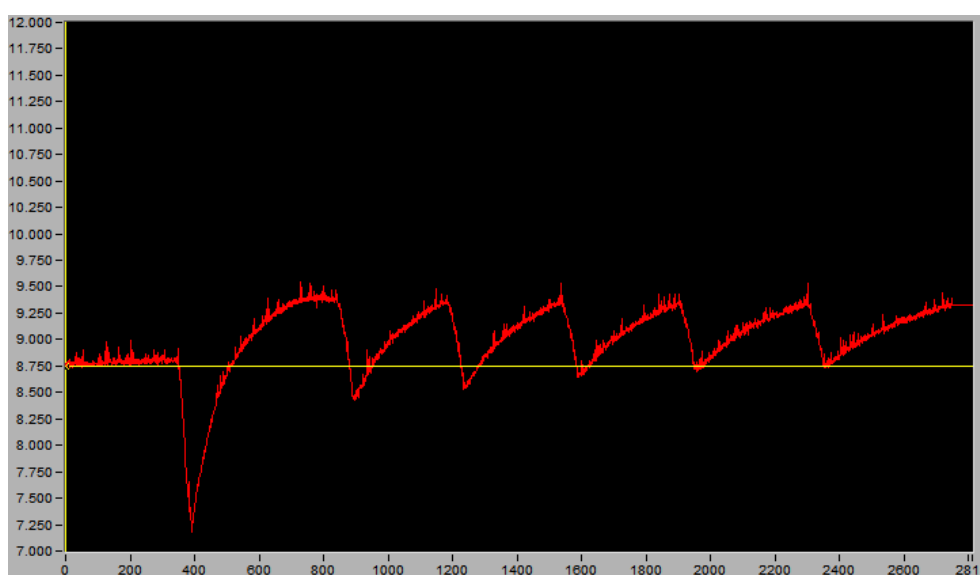


Figura 4.12 - Perfil de pH obtido no ensaio pH 3

Neste ensaio optou-se por manter o volume de cada pulso alimentado do ensaio anterior, ou seja, foram alimentados 1,1 L por pulso, com o objetivo de dar mais pulsos ao longo do processo, aproximando-o de uma alimentação contínua. Assim, os parâmetros $T_{BombaLigada}$ e $T_{BombaDesligada}$ foram inicialmente mantidos. No entanto, após a alimentação do 10º pulso observou-se uma variação no pH muito baixa e optou-se por subir o volume do pulso dado para 2,2, ou seja, $\frac{1}{2}$ do volume alimentado num ciclo do SBR.

Na Tabela 4.25 estão representados os parâmetros aplicados no programa no início do processo. O valor de pH_{sp} foi estimado utilizando o pH inicial deste ensaio e um rácio pH_{sp}/pH_i ligeiramente inferior ao do ensaio anterior, de forma a tentar evitar que se torne necessário alterar o *setpoint* no decorrer da acumulação, o cálculo efetuado está representado na Equação 16.

$$pH_{sp} = pH_i \times \text{rácio} \frac{pH_{sp}}{pH_i} = 8,825 \times 1,07 = 9,40$$

Equação 16 - Cálculo do pH setpoint do ensaio pH 3

Tabela 4.25 - Parâmetros aplicados no programa na acumulação pH 3

Parâmetros	Valor
Np, média	120
T_{Contador} (s)	0
pH_{sp}	9,40
T_{BombaLigada} (s)	75,9
T_{BombaDesligada} (s)	75,9

Este ensaio começou às 10:45h e terminou às 16:01h tendo durado 5,27 horas. Adicionou-se um total de 15 pulsos, equivalendo a 22 litros de substrato. Na Figura 4.13 estão representados os tempos de consumo de cada pulso dado nesta acumulação, bem como a quantidade de PHA por litro de reator. Os resultados obtidos desta análise são concordantes com os obtidos nos ensaios anteriores. É possível, ainda, identificar um *outlier*, o 6º pulso, que ocorreu quando tinham passado 1,23 horas de ensaio. Neste pulso o pH_{sp} predefinido não foi atingido e quando se reparou nesse facto já tinham passado alguns minutos, assim, o tempo de consumo deste pulso aumentou em relação ao esperado.

É importante referir, ainda, que quando se mudou o volume de alimentação o tempo de consumo do pulso não aumentou na mesma proporção. Essa subida só se fez notar mais acentuadamente nos últimos 3 pulsos, onde se observa um notório aumento no tempo de consumo, representado na Figura 4.13.

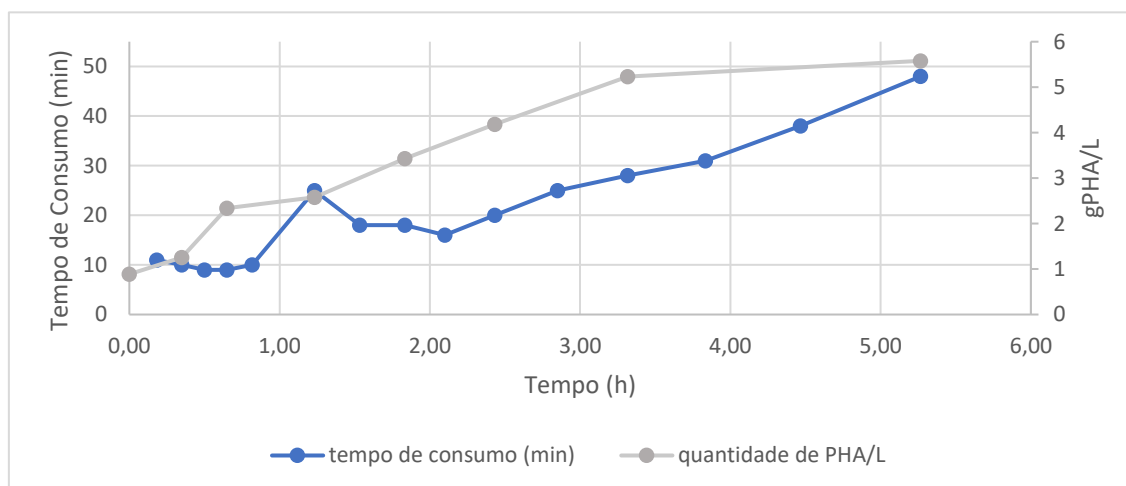


Figura 4.13 - Tempo de consumo dos pulsos e quantidade de PHA por litro de reator do ensaio pH 3

Na Figura 4.14 estão representados os valores de pH mínimo atingido após a adição de cada pulso, bem como o valor que acionou a alimentação automática. Em relação aos valores de pH mínimo pode-se observar a tendência crescente. Contudo, no 11º pulso o valor de pH mínimo baixa contrariando a tendência até ao momento. Esse facto

aconteceu devido ao aumento do volume dos pulsos dados, fazendo com que mais VFA fossem alimentados ao reator e consecutivamente o pH baixasse mais.

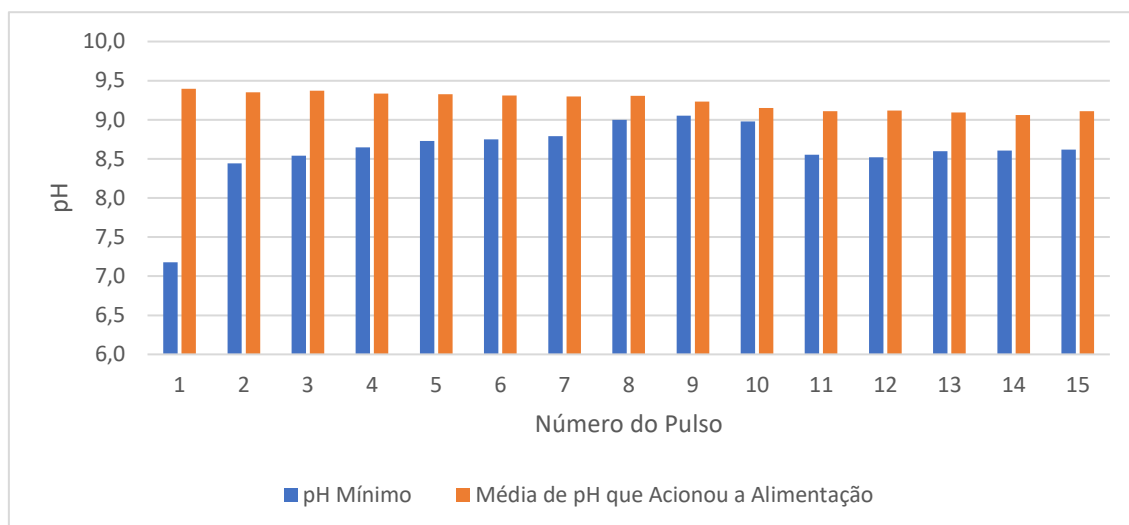


Figura 4.14 - pH mínimo e pH que acionou a alimentação no ensaio pH 3

Ainda observando a Figura 4.14 na coluna da média que acionou a alimentação é possível concluir que foi necessário alterar o *setpoint* do pH em diferentes momentos, de forma a ser possível continuar o processo de acumulação. O primeiro momento foi depois do 3º pulso, em que o pH_{sp} foi alterado para 9,30 e assim permaneceu até ao 6º pulso. Nesse momento foi novamente necessário modificar o parâmetro de alimentação para 9,25, valor esse que apenas se manteve até ao 9º pulso, sendo necessário alterar novamente o pH_{sp}. O valor estabelecido foi de 9,1 e foi suficiente até ao final do processo. De forma semelhante ao ensaio pH 2 pode-se concluir que este algoritmo, da forma como está desenhado, não será capaz de funcionar em todos os casos em que é posto à prova, tornando necessário o acompanhamento permanente.

Na Tabela 4.26 está representado um resumo do desempenho deste ensaio no que diz respeito à quantidade de PHA produzida. Neste processo de acumulação 56% do PHA foi produzido em 46% do tempo total, valores estes superiores aos obtidos nos ensaios anteriores. Esse facto poderá dever-se a ter sido alterado o volume do pulso, fazendo com que no final existisse mais substrato disponível dentro do reator.

Tabela 4.26 - Resumo da quantidade de PHA produzida no ensaio pH 3

Pulso	Tempo Cumulativo (horas)	% Tempo de Acumulação	Quantidade de PHA (g)	%PHA	% de PHA Total Produzido (g)
0	0,00	0%	29,2	15%	0%
2	0,35	7%	44,2	22%	5%
4	0,65	12%	87,5	33%	21%
6	1,23	23%	102,1	32%	26%
8	1,83	35%	143,5	43%	41%
10	2,43	46%	184,2	56%	56%
12	3,32	63%	253,4	61%	81%
15	5,27	100%	305,7	64%	100%

Neste ensaio foram produzidas no total 276,5 gramas de PHA, das quais 80% eram constituídas pelo monómero HB, mais uma vez, de acordo com o que seria esperado, estes valores estão representados na Tabela 4.27.

Tabela 4.27 - Características do polímero produzido no ensaio pH 3

Quantidade Produzida (g)	% HB	% HV	Quantidade de HB Produzida (g)	Quantidade de HV Produzida (g)
276,5	80%	20%	221,2	55,3

Procedeu-se seguidamente ao cálculo das produtividades volumétricas nos diferentes momentos deste processo e ao cálculo da produtividade volumétrica média, representadas na Tabela 4.28. O valor de produtividade volumétrica média deste ensaio foi de 0,96 gPHA por litro de reator por hora. Observa-se ainda que a produtividade volumétrica máxima representa cerca de 8 vezes a produtividade volumétrica no final do processo.

De referir que no 6º pulso a produtividade é inferior ao esperado, facto esse causado pelo tempo que demorou a corrigir o valor de pH_{sp}.

Tabela 4.28 - Produtividades volumétricas do ensaio pH 3

Pulso	Tempo de Consumo (horas)	PHA Produzido (g)	Produtividade Volumétrica (gPHA/L.h)	Produtividade Volumétrica Média (gPHA/L.h)
2	0,35	15	1,21	0,96
4	0,30	58	3,86	
6	0,58	73	0,63	
8	0,60	114	1,65	
10	0,60	155	1,54	
12	0,88	224	1,62	
15	1,95	277	0,49	

Calculou-se, então, a capacidade máxima de produção, de forma análoga aos ensaios anteriores. Tendo em conta o tempo de duração do processo será possível fazer 4,6 *batch* por dia, o que perfaz um total de 484 kg de PHA por ano.

De forma análoga às produtividades volumétricas, os valores de produtividade específica deste ensaio, representados na Tabela 4.29 inferiores aos do ensaio pH 2, a produtividade específica máxima equivale a 1/3, todavia, o valor de produtividade específica média é semelhante, como seria de esperar. Observa-se ainda que a produtividade específica máxima representa cerca de 5 vezes a produtividade específica final.

Neste ensaio a quantidade de biomassa no reator é superior ao dos últimos ensaios, onde nos dois primeiros casos esse valor era de cerca de 100 gramas de biomassa ativa, enquanto neste foi de cerca de 140 gramas.

Tabela 4.29 - Produtividades específicas do ensaio pH 3

Pulso	Produtividade Específica (gPHA/gXA.h)	Produtividade Específica Média (gPHA/gXA.h)
2	0,31	0,38
4	1,03	
6	0,18	
9	0,34	
12	0,65	
15	0,19	

Na Tabela 4.30 está representada a concentração do substrato utilizado no ensaio pH 3, bem como o volume e quantidade de VFA adicionados. Observa-se que neste caso a quantidade adicionada, em gCQO, foi superior à dos ensaios anteriores.

Tabela 4.30 - Concentração do substrato utilizado e volumes adicionados no ensaio pH 3

Concentração (gCQO/L)	Volume de Pulso (L)	Volume Adicionado (L)	Quantidade Adicionada (gCQO)
21,8	1,1 e 2,2	22	480,7

Apesar da concentração do substrato ter variado em relação aos ensaios anteriores, a composição do mesmo permaneceu aproximadamente constante, como está representado na Tabela 4.31. Mais uma vez, o ácido adicionado em maior quantidade foi o ácido butírico.

Tabela 4.31 - Composição do substrato alimentado no ensaio pH 3

Ácido Láctico	Ácido Acético	Ácido Propiónico	Etanol	Ácido Butírico	Ácido Valérico
0%	23%	5%	9%	59%	4%

Observando a Figura 4.15 é possível concluir que a grande maioria do substrato alimentado foi consumido. Nesta acumulação 82% dos ácidos foram consumidos, existindo um bom aproveitamento comparável ao do ensaio de pH 2 e superior ao ensaio pH 1. Conclui-se, então, que uma estratégia de alimentação com pulsos de volume inferior poderá ser melhor tanto a nível de produtividade, como a nível de aproveitamento dos ácidos.

Em relação ao consumo específico de cada VFA, neste ensaio, a percentagem de consumo, em relação ao total alimentado, foi superior a 65% em todos os casos, com destaque para as percentagens de 89% e 81% do ácido butírico e do ácido valérico, respetivamente.

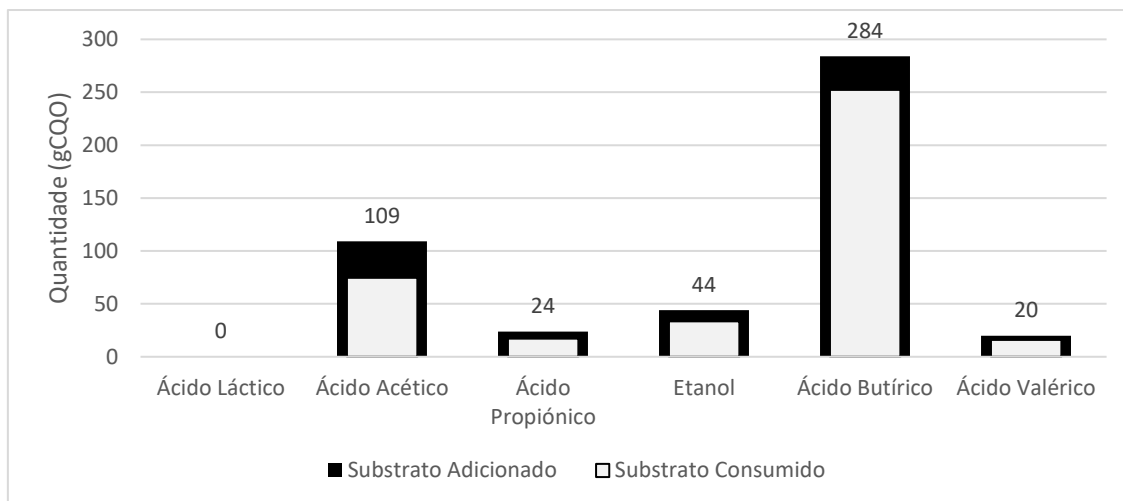


Figura 4.15 - Quantidade de VFA adicionada e consumida no ensaio pH 3

Para terminar a descrição do ensaio pH 3 foi efetuado o cálculo das velocidades de consumo médias para cada VFA alimentado, representadas na Tabela 4.32. Os valores obtidos estão de acordo com os do ensaio anterior, o que seria de esperar tendo em conta que, em ambos, a estratégia de controlo foi semelhante.

Tabela 4.32 - Velocidades de Consumo Médias dos VFA adicionados no ensaio pH 3

VFA	Ácido Láctico	Ácido Acético	Ácido Propiónico	Etanol	Ácido Butírico	Ácido Valérico
Velocidade de Consumo Média (gCQO/h)	0	14,2	3,27	6,38	47,8	3,03

Ensaio de 14 de dezembro – pH 4

Na Figura 4.16 está representado o perfil de pH obtido no ensaio de 14 de dezembro. Neste caso o perfil apresentado diz respeito a todo o processo de acumulação efetuado neste dia

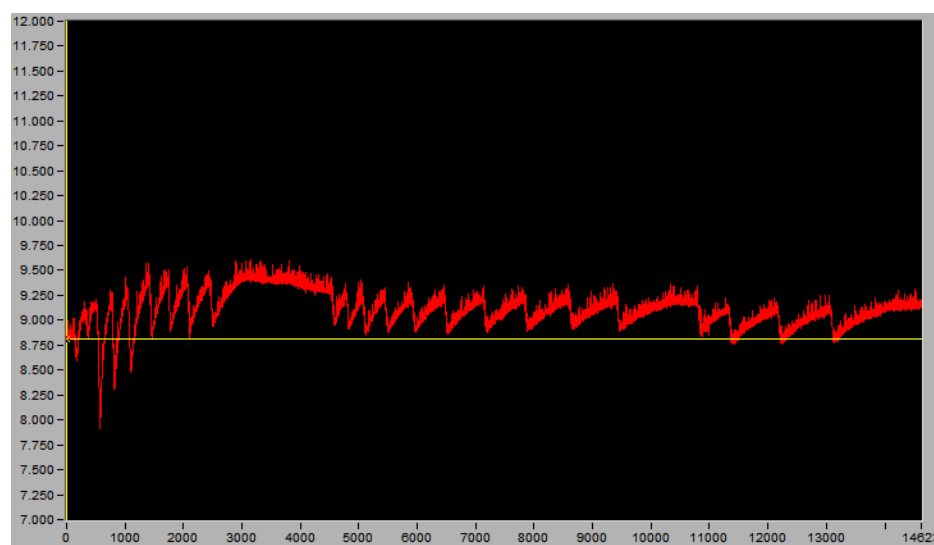


Figura 4.16 - Perfil de pH obtido no ensaio pH 4

Neste ensaio optou-se por manter o volume de cada pulso alimentado, ou seja, foram alimentados 1,1 L por pulso, contudo esse valor foi mantido até ao final do processo. Novamente os parâmetros $T_{\text{BombaLigada}}$ e $T_{\text{BombaDesligada}}$ foram mantidos.

Na Tabela 4.33 estão representados os parâmetros aplicados no programa no início do processo. O valor de pH_{sp} foi estimado de forma igual à do ensaio anterior. Na Equação 17 está representado o cálculo efetuado.

$$pH_{sp} = pH_i \times \text{rácio} \frac{pH_{sp}}{pH_i} = 8,849 \times 1,07 = 9,45$$

Equação 17 - Cálculo do pH setpoint do ensaio de pH 4

Tabela 4.33 - Parâmetros aplicados no programa na acumulação pH 4

Parâmetros	Valor
Np, média	120
T_{Contador} (s)	0
pH_{sp}	9,45
T_{BombaLigada} (s)	75,9
T_{BombaDesligada} (s)	75,9

Este ensaio começou às 10:41h e terminou às 16:45h tendo durado 6,07 horas. Adicionou-se um total de 23 pulsos, equivalendo a 25,3 litros de substrato. Na Figura 4.17 estão representados os tempos de consumo de cada pulso dado nesta acumulação, bem como a quantidade de PHA por litro de reator. Os resultados obtidos desta análise são concordantes com os obtidos nos ensaios anteriores. Neste ensaio é possível observar dois *outliers*, o 9º e 19º pulsos, explicados pelo facto de o pH_{sp} não ter sido atingido. Nestes pulsos foi necessário alterar o valor pH_{sp} . Retirando os valores anómalos é possível identificar a tendência crescente no tempo de consumo dos pulsos com o aumento da quantidade de PHA acumulada pela cultura.

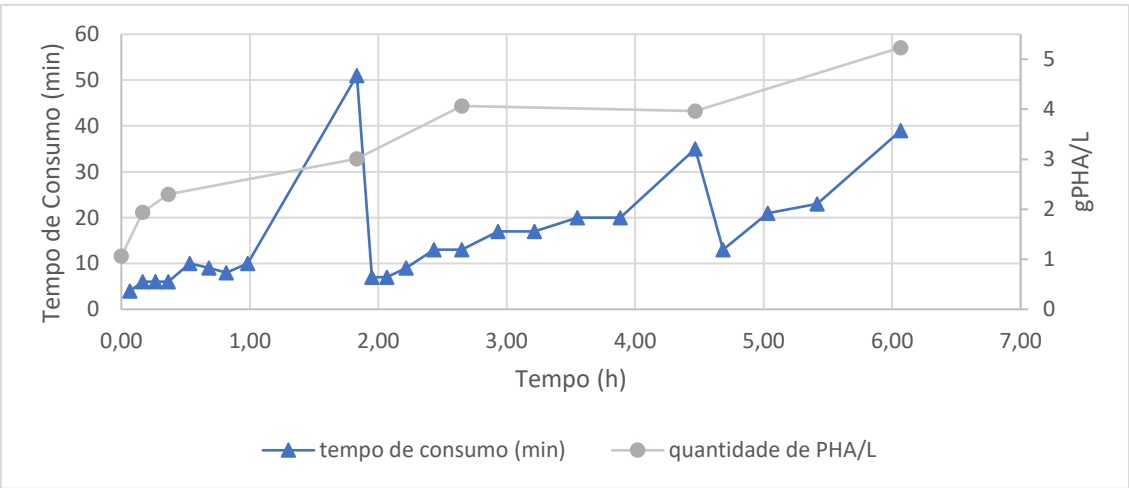


Figura 4.17 - Tempo de consumo dos pulsos e quantidade de PHA por litro de reator do ensaio pH 4

Na Figura 4.18 estão representados os valores de pH mínimo e média de pH que acionou a alimentação para cada um dos pulsos dados neste ensaio. Em primeiro lugar, conclui-se que foi necessário alterar o parâmetro pH_{sp} por duas vezes. No 9º pulso o valor foi

alterado de 9,45 para 9,20 e no 19º pulso passou de 9,20 para 9,10, ainda assim, comparativamente ao ensaio pH 3 o número de alterações necessárias ao *setpoint* foi inferior.

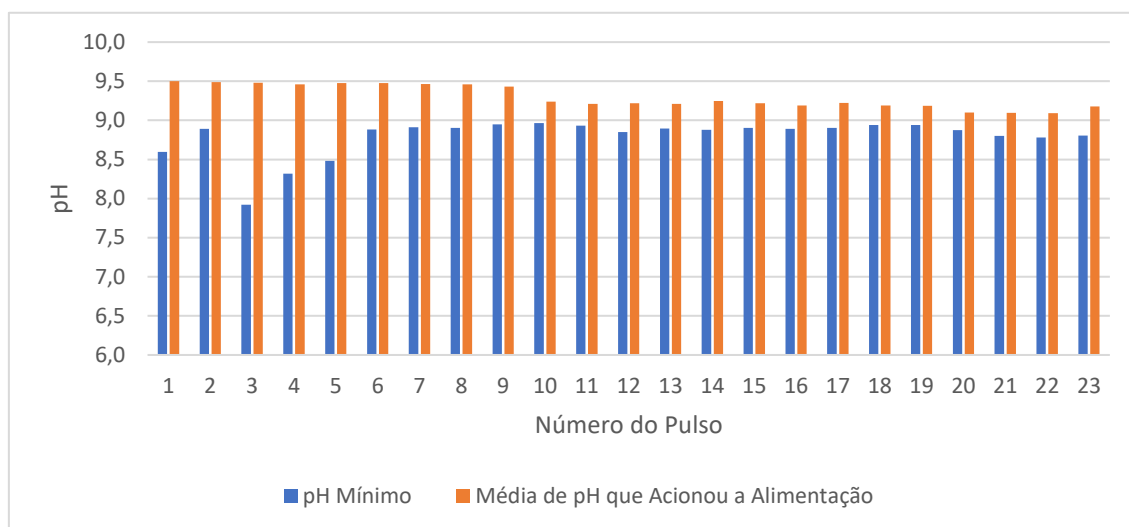


Figura 4.18 - pH mínimo e pH que acionou a alimentação no ensaio pH 4

Em segundo lugar, ainda na Figura 4.18, é, novamente, observável a tendência crescente no valor de pH mínimo atingido após o pulso. Contudo, esse valor parece estabilizar em torno de um valor médio de 8,9 ao fim de algum tempo.

Na Tabela 4.34 está representado um resumo da quantidade de PHA produzida neste ensaio. Numa primeira análise observa-se que no final do processo tinham sido acumuladas 305 gramas de PHA pela cultura, obtendo-se no final uma percentagem de 58% de PHA no meio intracelular. Ainda em relação à percentagem de PHA dentro das células, observa-se que existem dois valores fora do esperado, o valor do 4º pulso e o valor do 19º pulso. Nestes pulsos a percentagem diminui em relação aos pulsos anteriores, o que poderá querer dizer que estes valores são *outliers*.

Fazendo uma análise semelhante à realizada nos ensaios anteriores, observa-se que, neste caso, em 44% do tempo total da acumulação já se tinha produzido 60% do total de PHA produzido. Este valor vai ao encontro dos valores obtidos anteriormente.

Tabela 4.34 - Resumo da quantidade de PHA produzida no ensaio pH 4

Pulso	Tempo Cumulativo (horas)	% Tempo de Acumulação	Quantidade de PHA (g)	%PHA	% de PHA Total Produzido (g)
0	0,00	0%	35,0	19%	0%
2	0,17	3%	68,3	31%	12%
4	0,40	6%	86,1	30%	19%
9	1,83	30%	129,2	36%	35%
14	2,65	44%	196,8	49%	60%
19	4,47	74%	213,8	46%	66%
23	6,07	100%	305,1	58%	100%

Em relação às características do polímero produzido, representadas na Tabela 4.35 conclui-se que do total de 270,1 gramas 79% são constituídas pelo monómero HB, valor esse concordante com os obtidos nos ensaios anteriores.

Tabela 4.35 - Características do polímero produzido no ensaio pH 4

Quantidade Produzida (g)	% HB	% HV	Quantidade de HB Produzida (g)	Quantidade de HV Produzida (g)
270,1	79%	21%	213,4	56,7

De seguida procedeu-se ao cálculo das produtividades volumétricas observadas neste ensaio, representadas na Tabela 4.36. Conclui-se que a produtividade volumétrica média foi de 0,76 gPHA por litro de reator por hora e que a produtividade volumétrica máxima foi cerca de 6 vezes superior à produtividade volumétrica final.

Tabela 4.36 - Produtividades volumétricas do ensaio pH 4

Pulso	Tempo de Consumo (horas)	PHA Produzido (g)	Produtividade Volumétrica (gPHA/L.h)	Produtividade Volumétrica Média (gPHA/L.h)
2	0,17	33	5,67	0,76
4	0,20	51	2,38	
9	1,47	94	0,68	
14	0,82	162	1,71	
19	1,82	179	0,17	
23	1,60	270	0,98	

Considerando o tempo de duração de 6,07 horas deste ensaio estimou-se a capacidade de produção anual. Conclui-se que utilizando estas condições de operação e controlo será possível produzir 383 kg de PHA por ano.

Na Tabela 4.37 estão representados os valores de produtividade específica obtidos e observa-se, na linha dos ensaios anteriores, um valor de 0,32 gramas de PHA por grama de biomassa ativa por hora. Este valor aparenta ser ligeiramente inferior ao dos ensaios anteriores, mas é preciso ter em conta que este ensaio demorou mais tempo, fator esse que influencia a produtividade calculada. Observa-se que o valor da produtividade específica máxima equivale a cerca de 4 vezes da produtividade específica global.

Tabela 4.37 - Produtividades específicas do ensaio pH 4

Pulso	Produtividade Específica (gPHA/gXA.h)	Produtividade Específica Média (gPHA/gXA.h)
2	1,28	0,32
4	0,57	
9	0,19	
14	0,53	
19	0,06	
24	0,37	

Quanto ao substrato utilizado neste ensaio, cuja concentração se pode observar na Tabela 4.38, conclui-se que foi semelhante ao do ensaio pH 3, no entanto, como foi adicionado um maior volume no total do ensaio a quantidade adicionada foi superior.

Tabela 4.38 - Concentração do substrato utilizado e volumes adicionados no ensaio pH 4

Concentração (gCQO/L)	Volume de Pulso (L)	Volume Adicionado (L)	Quantidade Adicionada (gCQO)
20,6	1,1	25	515,4

Em relação à composição do substrato, representada na Tabela 4.39 a conclusão é semelhante à retirada na tabela anterior. Este substrato era praticamente idêntico ao do ensaio de 13 de dezembro.

Tabela 4.39 - Composição do substrato utilizado no ensaio pH 4

Ácido Láctico	Ácido Acético	Ácido Propiónico	Etanol	Ácido Butírico	Ácido Valérico
0%	23%	5%	9%	59%	4%

Para terminar a descrição do ensaio de 14 de dezembro procedeu-se ao cálculo da quantidade de substrato acumulada no final do processo e das velocidades de consumo médias. Na Figura 4.19 estão representadas as quantidades de substrato adicionadas e consumidas por cada VFA. Das cerca de 515 gramas de CQO alimentadas ao reator 395 foram consumidas, ou seja, 77% do substrato alimentado foi consumido. Este valor é inferior ao obtidos nos dois ensaios anteriores, o que significa que neste processo existiu maior acumulação de ácidos no final. Novamente, é possível observar que os ácidos consumidos em maior percentagem, tendo em conta as quantidades de cada um adicionadas, foram o ácido butírico (87%) e o ácido valérico (84%).

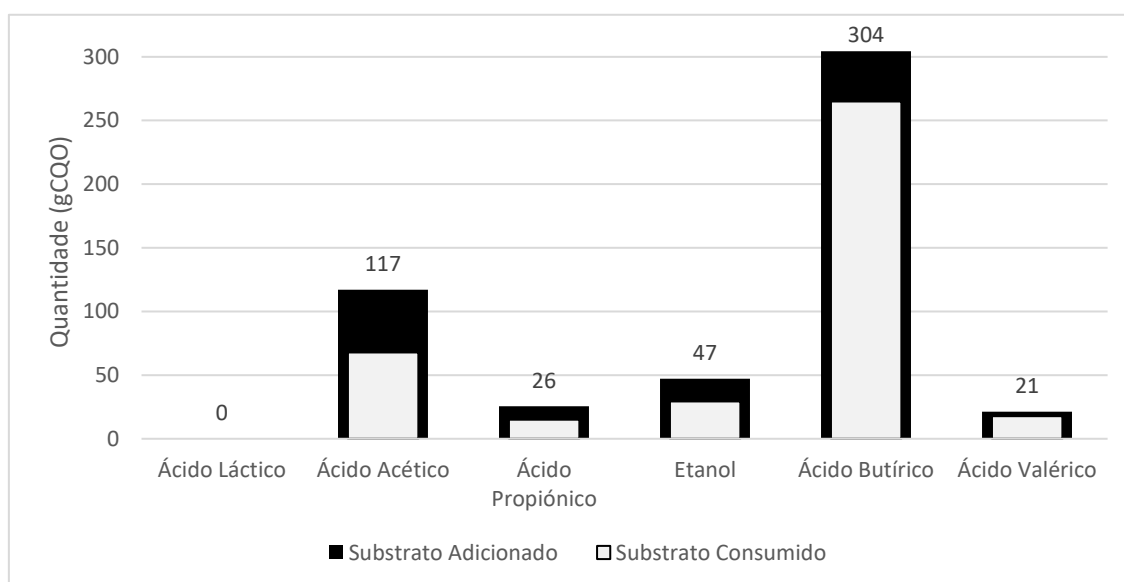


Figura 4.19 - Quantidade de VFA adicionada e consumida no ensaio pH 4

Tendo em conta a análise anterior acerca do consumo dos VFA seria esperado que as velocidades de consumo fossem inferiores às dos dois ensaios anteriores, facto esse que se confirma observando a Tabela 4.40.

Tabela 4.40 - Velocidades de consumo dos VFA alimentados no ensaio pH 4

VFA	Ácido Lático	Ácido Acético	Ácido Propiónico	Etanol	Ácido Butírico	Ácido Valérico
Velocidade de Consumo Média (gCQO/h)	0	11,18	2,49	4,81	43,63	2,94

Ensaio de 28 de dezembro – pH 5

Novamente, inicia-se a descrição do ensaio com uma representação do perfil de pH obtido, Figura 4.20. Nesta figura está representada a maioria do sinal observado neste dia, com exceção do 1º pulso.

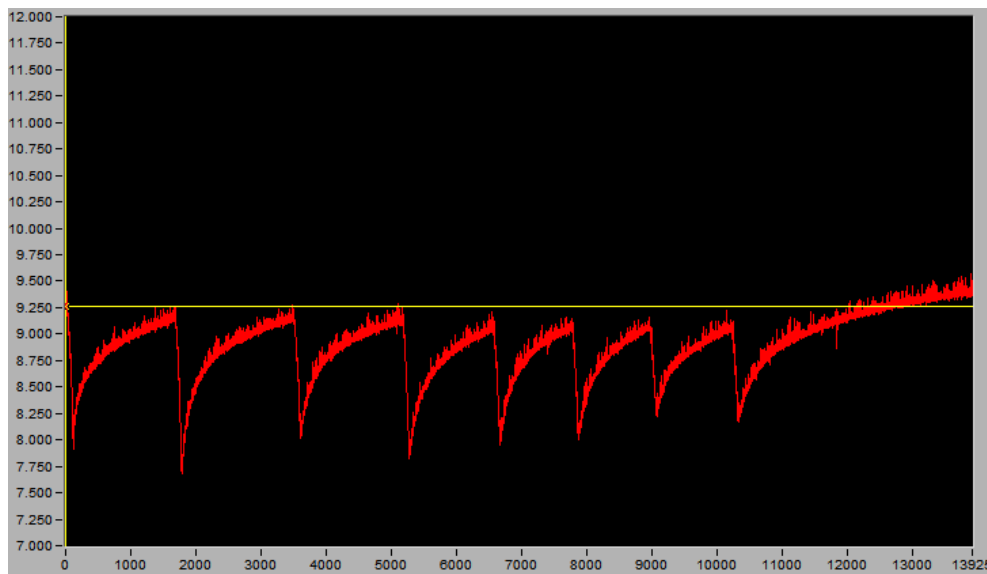


Figura 4.20 - Perfil de pH obtido no ensaio pH 5

Este foi o último ensaio de produção à escala piloto utilizando como método de controlo o 1º algoritmo. Optou-se por alterar o volume dos pulsos alimentados para ½ do volume alimentado num ciclo do reator SBR de forma a se obter uma melhor análise do efeito do volume adicionado. Assim, o volume por pulso foi calculado segundo a Equação 19.

$$V_{pulso} = \frac{1}{2} \times \frac{V_{purga} \times V_{ciclo (SBR)}}{V_{SBR}} = \frac{1}{2} \times \frac{25 L \times 17,58 L}{100 L} = 2,2 L$$

Equação 18 - Cálculo do Volume de um pulso equivalente a ½ do ciclo do SBR

Novamente, como se mudou o volume a alimentar por cada pulso tornou-se necessário recalcular o valor do parâmetro $T_{BombaLigada}$. Utilizou-se a Equação 19 para determinar esse parâmetro.

$$T_{Bomba Ligada} = \frac{V_{pulso} \times t_{calibração}}{V_{calibração}} = \frac{2,2 L \times 69 s}{1 L} = 151,8 s$$

Equação 19 - Cálculo do tempo de bomba ligada de um pulso equivalente a ½ do ciclo do SBR

Na Tabela 4.41 estão representados os parâmetros que foram introduzidos no programa no início desta acumulação. O valor de $T_{BombaDesligada}$ utilizado, de forma semelhante aos

ensaios anteriores, foi igual ao $T_{\text{BombaLigada}}$. Em relação ao valor de pH_{sp} , neste caso, optou-se por 9,30 correspondente a um rácio $\text{pH}_{\text{sp}}/\text{pH}_i$ de 1,03. Utilizou-se um valor inferior ao dos ensaios anteriores de forma a perceber a viabilidade de se efetuar, tal como aconteceu no ensaio pH 1, um ensaio sem alteração do *setpoint*.

Tabela 4.41 - Parâmetros aplicados no programa na acumulação pH 5

Parâmetros	Valor
Np, média	120
T_{Contador} (s)	0
pH_{sp}	9,30
$T_{\text{BombaLigada}}$ (s)	151,8
$T_{\text{BombaDesligada}}$ (s)	151,8

Este ensaio que teve uma duração de 5,85 horas, começou às 10:34h e acabou às 17:25h. Adicionou-se um total de 9 pulsos, equivalendo a 19,8 litros. Na Figura 4.21 observa-se as progressões do tempo de consumo dos pulsos e a quantidade de PHA por litro de reator. Neste caso a tendência observada no conjunto dos ensaios anteriores não se verifica em toda a acumulação, o que contraria as expectativas. Contudo, este facto poderá resultar da alteração do valor de *setpoint* para um valor demasiado baixo que levou a uma alimentação precoce de substrato. No 4º pulso alterou-se o valor de pH_{sp} de 9,30 para 9,10, ainda assim, isso não explica a tendência decrescente que se verifica no consumo dos pulsos já depois da mudança desse parâmetro. Observa-se ainda que no último pulso o tempo de consumo voltou à gama de valores esperados.

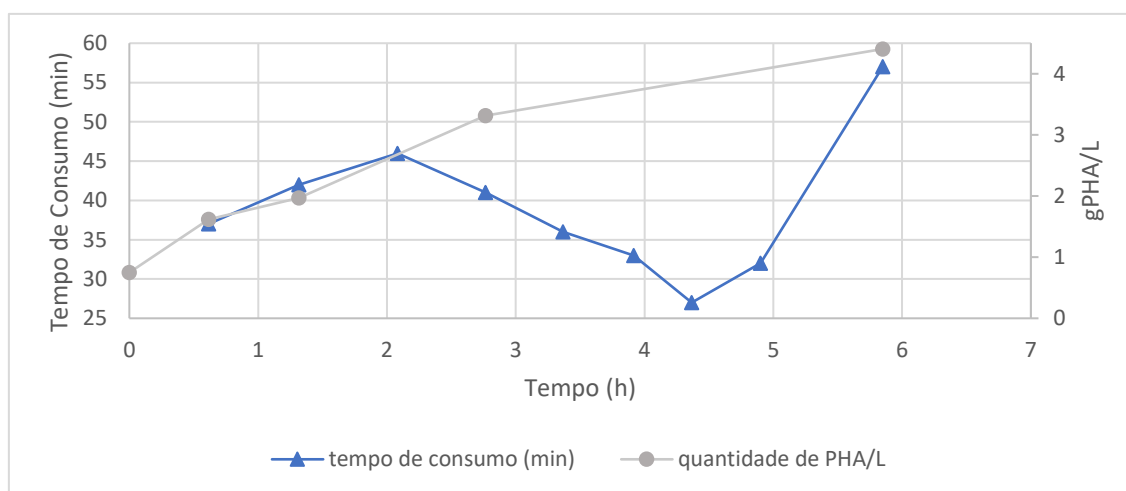


Figura 4.21 - Tempo de consumo dos pulsos e quantidade de PHA por litro de reator do ensaio pH 5

Após a análise dos tempos de consumo dos pulsos procedeu-se, novamente, ao estudo dos valores de pH ao longo deste último ensaio, representado na Figura 4.22. No que se refere aos valores de pH mínimo, conclui-se que estes estão de acordo com a tendência crescente observada nos ensaios anteriores. Em relação ao parâmetro pH_{sp} foi necessário alterá-lo apenas uma vez, antes do 4º pulso, como já havia sido referido. Nesse momento o valor passou de 9,30 para 9,10, comprovando que se a margem entre o pH_{sp} e o pH_i for mais baixa será necessário alterar um menor número de vezes este parâmetro. Ainda

assim, como já foi observado no ensaio pH 1, isso poderá levar a um pior aproveitamento dos VFA alimentados.

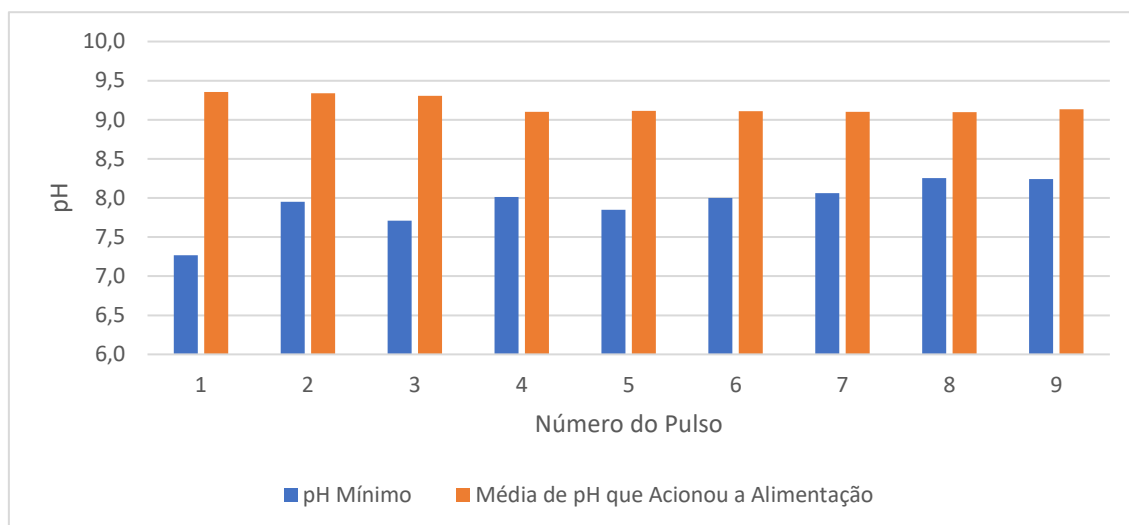


Figura 4.22 - pH mínimo e pH que acionou a alimentação no ensaio pH 5

Na Tabela 4.42 está representado um resumo com a quantidade de PHA acumulado, bem como outros valores que com ela se relacionam. Observa-se que, no final do processo existiam 233 gramas de PHA armazenado pela cultura, valor esse inferior ao obtido nos ensaios anteriores, ainda assim, foi atingida uma percentagem de 61% PHA. Observa-se, também, que em 47% do tempo total do processo se produziu 55% do total de PHA. Esse valor também é inferior ao obtido nos ensaios anteriores.

Tabela 4.42 - Resumo da quantidade de PHA produzida no ensaio pH 5

Pulso	Tempo Cumulativo (horas)	% Tempo de Acumulação	Quantidade de PHA (g)	%PHA	% de PHA Total Produzido (g)
0	0,00	0%	24,7	17%	0%
1	0,62	11%	57,0	33%	16%
2	1,32	23%	73,8	37%	24%
4	2,77	47%	138,6	55%	55%
9	5,85	100%	232,6	61%	100%

Em relação às características do polímero produzido, representadas na Tabela 4.43, conclui-se que das 207,9 gramas produzidas 77% eram constituídas pelo monómero HB. Esse valor difere um pouco dos obtidos nos ensaios anteriores, mas não é significativamente diferente.

Tabela 4.43 - Características do polímero produzido no ensaio pH 5

Quantidade Produzida (g)	% HB	% HV	Quantidade de HB Produzida (g)	Quantidade de HV Produzida (g)
207,9	77%	23%	160,1	47,8

Na Tabela 4.44 estão representadas as produtividades volumétricas por pulso e a produtividade volumétrica média do ensaio de dia 28 de dezembro. Mais uma vez,

observa-se uma tendência decrescente na produtividade volumétrica à medida que o tempo do processo aumenta. Conclui-se, ainda, que a produtividade volumétrica média foi de 0,67 gPHA por litro de reator por hora e que a produtividade volumétrica máxima representa cerca de 3 vezes a produtividade volumétrica final.

Tabela 4.44 - Produtividades volumétricas do ensaio pH 5

Pulso	Tempo de Consumo (horas)	PHA Produzido (g)	Produtividade Volumétrica (gPHA/L.h)	Produtividade Volumétrica Média (gPHA/L.h)
1	0,62	32	1,49	0,67
2	0,70	49	0,64	
4	1,45	114	1,07	
9	3,08	208	0,58	

Mais uma vez, efetuou-se o cálculo da capacidade de produção máxima. Utilizando as condições deste ensaio é possível fazer 4,1 *batch* por dia produzindo-se 338 kg de PHA por ano.

Calcularam-se, de forma análoga aos ensaios anteriores, as produtividades específicas por pulso e a produtividade específica média deste processo, representadas na Tabela 4.45. Observa-se que as produtividades específicas por pulso foram ligeiramente inferiores à maioria dos ensaios anteriores, todavia o valor da produtividade específica média aproxima-se do esperado. Conclui-se, então, que apesar de existirem pequenas oscilações a cultura utilizada nestes ensaios de produção manteve-se constante, a nível de seleção de microrganismos.

Observou-se, ainda, uma produtividade específica média de 0,34 gPHA por g de biomassa ativa por hora e que o valor de produtividade específica máximo foi apenas 1,3 vezes superior à produtividade específica final.

Tabela 4.45 - Produtividades específicas do ensaio pH 5

Pulso	Produtividade Específica (gPHA/gXA.h)	Produtividade Específica Média (gPHA/gXA.h)
1	0,51	0,34
2	0,23	
4	0,23	
9	0,39	

Relativamente ao substrato utilizado neste ensaio conclui-se que em termos de concentração se encontra na gama das concentrações observadas nos ensaios anteriores, conforme representado na Tabela 4.46. Considerando que foi alimentado um volume inferior, relativamente ao procedimento anterior, a quantidade total de VFA adicionada foi a menor de todas as experiências de produção utilizando este algoritmo.

Tabela 4.46 - Concentração do substrato utilizado e volumes adicionados no ensaio pH 5

Concentração (gCQO/L)	Volume de Pulso (L)	Volume Adicionado (L)	Quantidade Adicionada (gCQO)
21,0	2,2	19,8	415,0

Na Tabela 4.47 está representada a composição do substrato utilizado neste ensaio e é observável que esta difere um pouco em relação às composições dos substratos anteriores. Observa-se que a percentagem de ácido butírico é superior, contudo esse facto não teve efeito direto na composição do polímero final.

Tabela 4.47 - Composição do substrato utilizado no ensaio pH 5

Ácido Láctico	Ácido Acético	Ácido Propiónico	Etanol	Ácido Butírico	Ácido Valérico
0%	21%	4%	4%	65%	6%

Para terminar a descrição do último ensaio de produção utilizando o 1º algoritmo calcularam-se as quantidades de VFA não consumidas e, posteriormente, as velocidades de consumo de cada. A Figura 4.23 representa as quantidades de VFA que foram adicionadas e consumidas ao longo deste ensaio. Em primeiro lugar observa-se que apenas 73% dos ácidos alimentados foram consumidos pela cultura, valor esse que representa um decréscimo no consumo de ácidos em relação à maioria dos ensaios anteriores, demonstrando que a estratégia aqui aplicada poderá ser menos eficaz. Em segundo lugar, no que se refere ao consumo individual de cada VFA observa-se uma tendência semelhante aos ensaios anteriores, onde os ácidos consumidos preferencialmente foram o ácido butírico (83%) e o ácido valérico (80%).

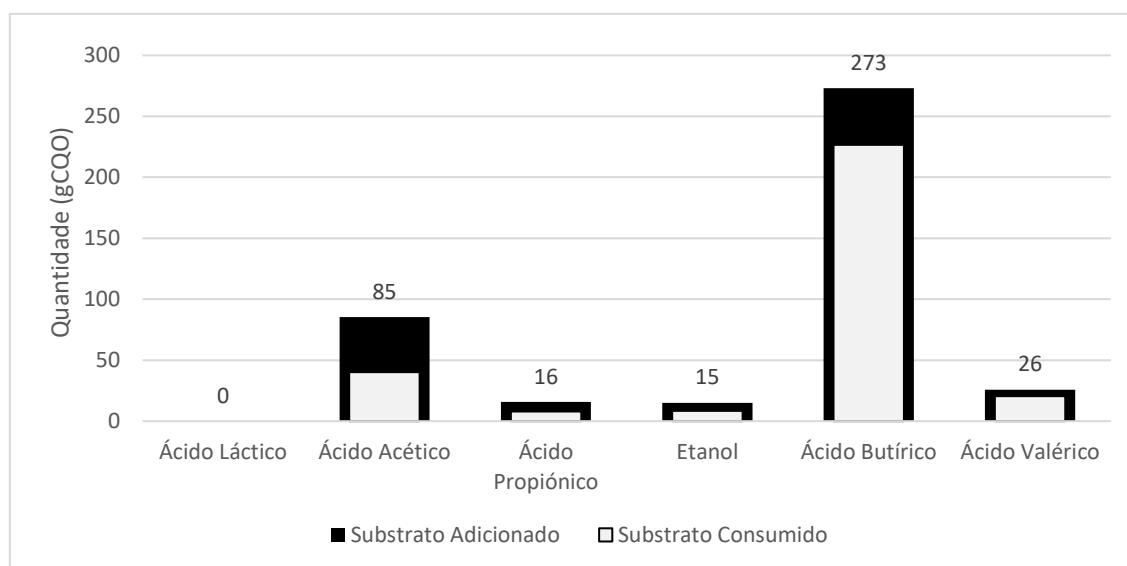


Figura 4.23 - Quantidade de VFA adicionada e consumida no ensaio pH 5

Na Tabela 4.48 estão representadas as velocidades de consumo dos VFA no ensaio de 28 de dezembro. Conclui-se que a maioria dos ácidos foram consumidos a uma velocidade inferior à dos ensaios anteriores, com a exceção do ácido valérico que apresenta uma velocidade de consumo superior. Esse facto dever-se-á possivelmente à quantidade superior de ácido valérico adicionado neste ensaio.

Tabela 4.48 - Velocidades de consumo dos VFA alimentados no ensaio pH 5

VFA	Ácido Lático	Ácido Acético	Ácido Propiónico	Etanol	Ácido Butírico	Ácido Valérico
Velocidade de Consumo Média (gCQO/h)	0	6,85	1,35	1,44	38,75	3,51

4.2.2 1º Algoritmo: Resumo dos Resultados

Terminada a descrição dos ensaios de produção à escala piloto que utilizaram como metodologia de controlo o algoritmo baseado na monitorização do pH, procedeu-se a um resumo dos principais resultados obtidos, de forma a ser possível efetuar algumas comparações. Na Tabela 4.49 estão representados os principais resultados retirados e conclui-se que o ensaio que obteve o melhor desempenho, no que diz respeito à produtividade volumétrica e quantidade de PHA produzida, foi o ensaio pH 3. Nesse ensaio obteve-se ainda um bom aproveitamento dos ácidos adicionados, semelhante ao do ensaio pH 2 e superior aos restantes.

É importante referir, ainda, que em termos de % PHA armazenada pela cultura no final da acumulação, os valores obtidos em todos os ensaios podem ser considerados satisfatórios.

Tabela 4.49 - Resumo dos principais resultados dos ensaios de produção utilizando o 1º algoritmo

Nº do Ensaio	Produtividade Volumétrica Média (gPHA/L.h)	Produtividade Específica Média (gPHA/gXA.h)	Quantidade Produzida (g)	% PHA	% VFA Consumidos
pH 1	0,63	0,34	246,2	71%	69%
pH 2	0,91	0,41	268,3	69%	83%
pH 3	0,96	0,38	276,5	64%	82%
pH 4	0,76	0,32	270,1	58%	77%
pH 5	0,67	0,34	207,9	61%	75%

4.2.3 2º Algoritmo: Descrição dos Ensaio

Neste subcapítulo serão descritos os ensaios de produção à escala piloto utilizando como método de controlo da alimentação a monitorização do DO ao longo do tempo. Estes ensaios realizaram-se entre 17 e 30 de novembro de 2017.

Relativamente ao valor de D_{sp} , este manteve-se constante em todos os ensaios que seguidamente se descrevem. Já o valor de DO_{sp} foi alterado tendo em conta alguns fatores abordados posteriormente.

Na Tabela 4.50 está representado um resumo dos volumes e quantidades de VFA adicionadas nestes ensaios e, de forma análoga à do 1º algoritmo, observa-se que a concentração do substrato não permaneceu constante ao longo das acumulações.

Tabela 4.50 - Resumo dos volumes e quantidades adicionadas de substrato

Nº do Ensaio	Volume Adicionado (L)	Quantidade Adicionada (gCQO)
1	22	521,1
2	-	-
3	17,6	450,0
4	13,2	276,6
5	27,5	535,1

Ensaio de 17 de novembro – DO 1

Na Figura 4.24 está representada parte do perfil de DO que se observou neste ensaio. O 1º pulso não é apresentado.

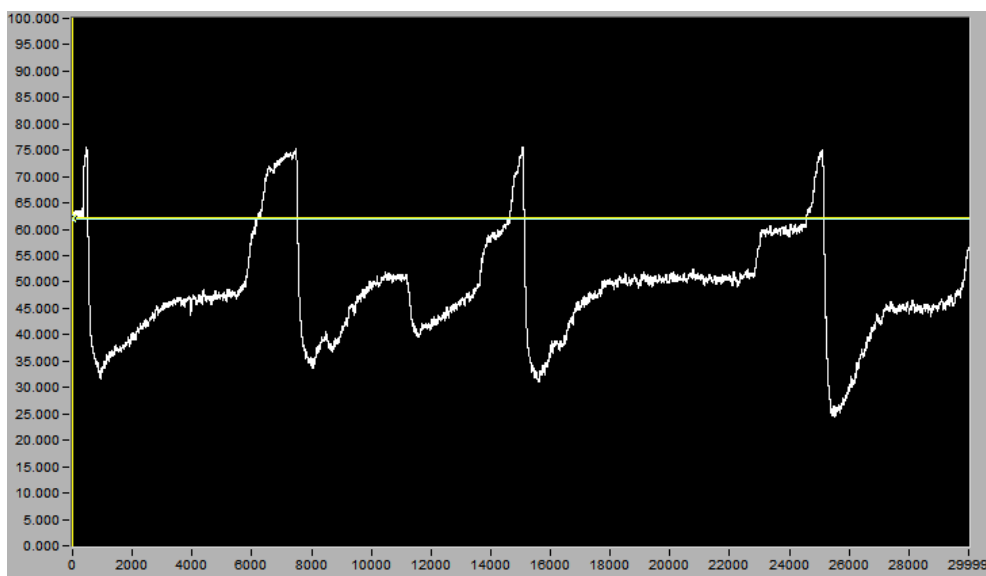


Figura 4.24 - Perfil de DO obtido no ensaio DO 1

Este foi o primeiro ensaio realizado com o objetivo de avaliar o desempenho do algoritmo de controlo da alimentação com *setpoint* do DO e *setpoint* do declive. O volume de cada pulso foi definido como sendo equivalente à alimentação de um do reator de seleção (SBR) e foi calculado de acordo com a Equação 10.

De forma semelhante à utilizada nos ensaios do 1º algoritmo, depois de definido o volume necessário de alimentar por pulso, calculou-se então o tempo que a bomba deveria ser ativada de forma a serem alimentados 4,4 L. Para tal, utilizaram-se os valores de calibração da bomba e o volume do pulso, segundo a Equação 20.

$$t_{\text{Bomba Ligada}} = \frac{V_{\text{pulso}} \times t_{\text{calibração}}}{V_{\text{calibração}}} = \frac{4,4 \text{ L} \times 66 \text{ s}}{1 \text{ L}} = 290,4 \text{ s}$$

Equação 20 - Cálculo do tempo de bomba ligada para os ensaios do 2º algoritmo de um pulso equivalente a 1 ciclo do SBR

Quanto aos parâmetros necessários de introduzir no programa no início de um ensaio, representados na Tabela 4.51, observa-se que, no caso deste algoritmo é necessário introduzir dois valores de *setpoint* distintos. O valor de D_{sp} , como referido anteriormente,

permaneceu constante em todos os ensaios, não se tendo verificado o mesmo no valor de DO_{sp} . Neste ensaio optou-se por atribuir a este último parâmetro o valor de 75%, pois em princípio, quando este valor é atingido significa que os VFA alimentados já teriam sido todos consumidos.

Tabela 4.51 - Parâmetros aplicados no programa na acumulação DO 1

Parâmetros	Valor
Np, média	120
T_{Contador} (s)	0
D_{sp}	0,01
DO_{sp}	75%
T_{BombaLigada} (s)	290,4
T_{BombaDesligada} (s)	290,4

Este ensaio, que teve uma duração de 6,37 horas, iniciou-se às 10:03h e terminou às 16:25h. Adicionou-se um total de 5 pulsos, equivalendo a 22 litros. Na Figura 4.25 estão representados os tempos de consumo de cada pulso dado nesta acumulação, bem como a quantidade de PHA por litro de reator. Considerando o valor gPHA/L do penúltimo pulso como um *outlier*, observa-se a uma tendência semelhante à dos ensaios do 1º algoritmo, onde o tempo de consumo dos pulsos aumenta com o aumento da quantidade de PHA acumulada.

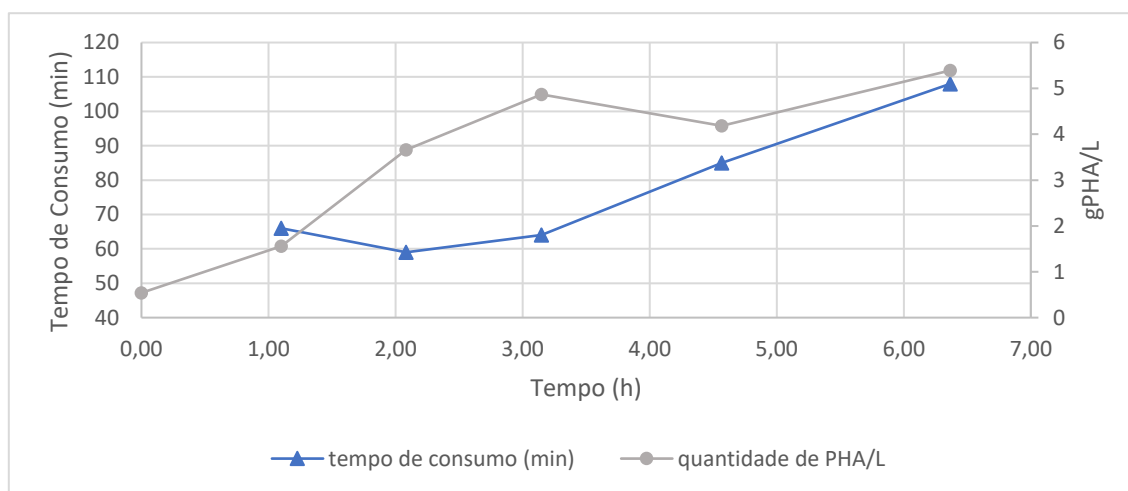


Figura 4.25 - Tempo de consumo dos pulsos e quantidade de PHA por litro de reator do ensaio DO 1

Tendo em conta que o parâmetro monitorizado neste algoritmo foi o DO, fez-se uma análise ao comportamento do mesmo ao longo da acumulação enfatizando o valor de DO mínimo atingido após cada pulso, o valor de DO máximo atingido no final de cada pulso e o declive calculado no momento da adição dos pulsos. Esses valores estão representados na Figura 4.26 e, em primeiro lugar, no que diz respeito ao DO mínimo atingido entre pulsos, observa-se que este tem uma tendência crescente, com exceção do último pulso. Este facto poderá ser explicado atendendo a que à medida que a cultura acumula PHA, a velocidade de consumo dos VFA diminui e, consequentemente, a quantidade de oxigénio que é consumida decresce.

Em segundo lugar, observando os valores de declive é possível concluir que, de forma análoga aos ensaios preliminares de teste do algoritmo, este valor decresce de pulso para pulso parecendo atingir um patamar ao fim de alguns pulsos. Apesar deste facto, o valor de *setpoint* atribuído para este parâmetro foi satisfatório, fazendo com que todos os pulsos fossem alimentados automaticamente.

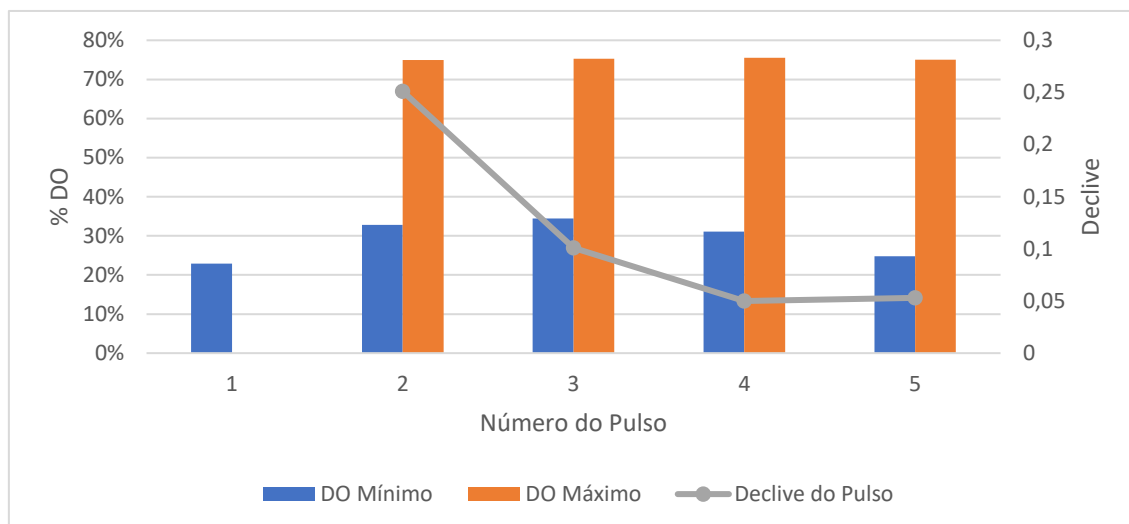


Figura 4.26 - Valores de DO e declives dos pulsos do ensaio DO 1

Na Tabela 4.52 estão representados alguns valores que permitem acompanhar a progressão da produção de PHA neste ensaio. Observa-se que em 49% do tempo de acumulação já se tinha produzido 74% do PHA total obtido no final deste ensaio. Mais uma vez, conclui-se que o valor de quantidade de PHA no 4º pulso pode ser considerado um *outlier*, pois observando a tabela nota-se que este sai totalmente da tendência esperada.

Tabela 4.52 - Resumo da quantidade de PHA produzida no ensaio DO 1

Pulso	Tempo Cumulativo (horas)	% Tempo de Acumulação	Quantidade de PHA (g)	%PHA	% de PHA Total Produzido
0	0,00	0%	17,8	11%	0%
1	1,10	17%	58,2	31%	14%
2	2,10	33%	152,9	59%	48%
3	3,15	49%	225,0	63%	74%
4	4,57	72%	211,9	59%	70%
5	6,37	100%	296,5	67%	100%

Seguidamente, estudaram-se as características do PHA produzido neste ensaio. Observando a Tabela 4.53 percebe-se que foram produzidas cerca de 279 gramas de PHA das quais 82% são formadas pelo monómero HB.

Tabela 4.53 - Características do polímero produzido no ensaio DO 1

Quantidade Produzida (g)	% HB	% HV	Quantidade de HB Produzida (g)	Quantidade de HV Produzida (g)
278,7	82%	18%	228,5	50,2

Em relação às produtividades volumétricas obtidas no ensaio de 17 de dezembro, representadas na Tabela 4.54, conclui-se que, de forma geral, apresentam a mesma tendência observada nos ensaios do 1º algoritmo, onde o valor de produtividade volumétrica média foi de 0,80 gPHA por litro de reator por hora. Em relação à diferença entre a produtividade volumétrica máxima e a final observa-se que a primeira representa cerca de três vezes o valor da segunda. É importante referir, mais uma vez, que o valor do 4º pulso sai da tendência esperada.

Tabela 4.54 - Produtividades volumétricas do ensaio DO 1

Pulso	Tempo de Consumo (horas)	PHA Produzido (g)	Produtividade Volumétrica (gPHA/L.h)	Produtividade Volumétrica Média (gPHA/L.h)
1	1,10	40	0,98	0,80
2	0,98	135	2,30	
3	1,07	207	1,46	
4	1,42	194	- 0,18	
5	1,80	279	0,86	

No referente à capacidade de produção anual deste ensaio, considerando um total de 3,8 *batch* diários será possível produzir cerca de 403 kg de PHA anualmente.

Após o cálculo das produtividades volumétricas efetuou-se o cálculo das produtividades específicas obtidas neste ensaio, representadas na Tabela 4.55. Os valores obtidos estão dentro da gama de valores dos ensaios anteriores, mostrando novamente que a composição da cultura utilizada não alterou consideravelmente neste período. Observou-se uma produtividade específica média de 0,43 gPHA por grama de biomassa ativa por hora e que o valor de produtividade específica máximo foi 2 vezes superior à produtividade específica final.

Tabela 4.55 - Produtividades específicas do ensaio DO 1

Pulso	Produtividade Específica (gPHA/gXA.h)	Produtividade Específica Média (gPHA/gXA.h)
1	0,36	0,43
2	0,94	
3	0,66	
4	-0,09	
5	0,46	

Na Tabela 4.56 estão representados alguns valores que caracterizam a concentração e condições de alimentação dos VFA. Adicionaram-se 521,1 gCQO de VFA ao longo dos 5 pulsos dados. A concentração do substrato, apesar de diferente, apresenta um valor próximo dos apresentados anteriormente.

Tabela 4.56 - Concentração do substrato utilizado e volumes adicionados no ensaio DO 1

Concentração (gCQO/L)	Volume de Pulso (L)	Volume Adicionado (L)	Quantidade Adicionada (gCQO)
23,7	4,4	22	521,1

A composição do substrato utilizado neste ensaio, representada na Tabela 4.57, demonstra que existem algumas variações em relação aos utilizados anteriormente, ainda assim, os valores de % HB obtidos no polímero final estão dentro da gama esperada.

Tabela 4.57 - Composição do substrato alimentado no ensaio DO 1

Ácido Láctico	Ácido Acético	Ácido Propiónico	Etanol	Ácido Butírico	Ácido Valérico
0%	22%	5%	4%	66%	3%

Seguidamente, calcularam-se as quantidades de VFA adicionadas e consumidas neste ensaio. Observando a Figura 4.27, conclui-se que 90% dos ácidos adicionados foram consumidos pela cultura. Aproximadamente todo o ácido butírico e valérico alimentados foram consumidos, 95% e 96% respetivamente. Esta análise demonstra que a adição de um novo pulso, neste ensaio, ocorreu no momento indicado, ou seja, quando já não existia grande % de VFA no reator.

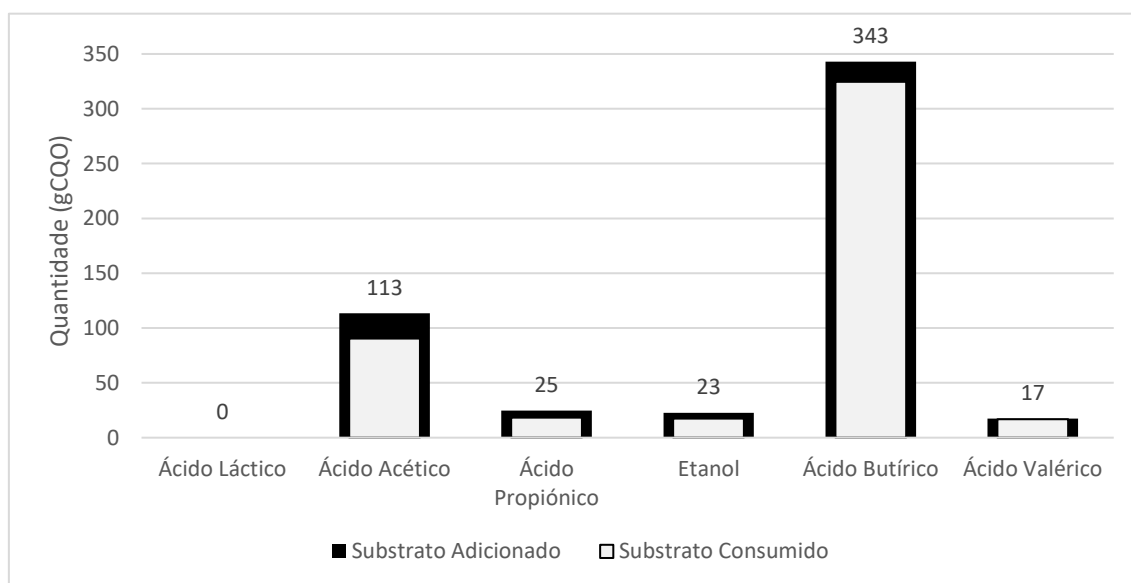


Figura 4.27 - Quantidade de VFA adicionada e consumida no ensaio DO 1

Para terminar efetuou-se, de forma semelhante à descrição dos ensaios anteriores, o cálculo das velocidades de consumo médias para os VFA adicionados neste processo, representadas na Tabela 4.58. Conclui-se que comparativamente aos ensaios anteriores as velocidades de consumo dos ácidos por parte da cultura aumentaram, no caso do ácido butírico correspondeu a um aumento de 21% em relação à média da velocidade de consumo dos ensaios que utilizaram o pH como parâmetro de controlo.

Tabela 4.58 - Velocidades de consumo dos VFA alimentados no ensaio DO 1

VFA	Ácido Lático	Ácido Acético	Ácido Propiónico	Etanol	Ácido Butírico	Ácido Valérico
Velocidade de Consumo Média (gCQO/h)	0	14,18	2,87	2,73	50,96	2,62

Ensaio de 20 de novembro – DO 2

Este foi o segundo ensaio realizado com o intuito de avaliar o desempenho do 2º algoritmo quando aplicado à escala piloto e desde cedo revelou problemas.

Como foi referido anteriormente, o sucesso deste tipo de processo de produção, tendo em consideração que a alimentação é controlada pelo sinal obtido, depende do bom funcionamento das sondas de aquisição desse mesmo sinal. Assim, tentou-se manter as mesmas calibradas e limpas ao longo dos ensaios efetuados. Contudo, a existência de interferências eletromagnéticas poderá também influenciar a obtenção dos sinais de forma negativa. Neste ensaio, devido a essas interferências não foi possível manter o algoritmo de controlo a funcionar, pois o sinal obtido não o permitia.

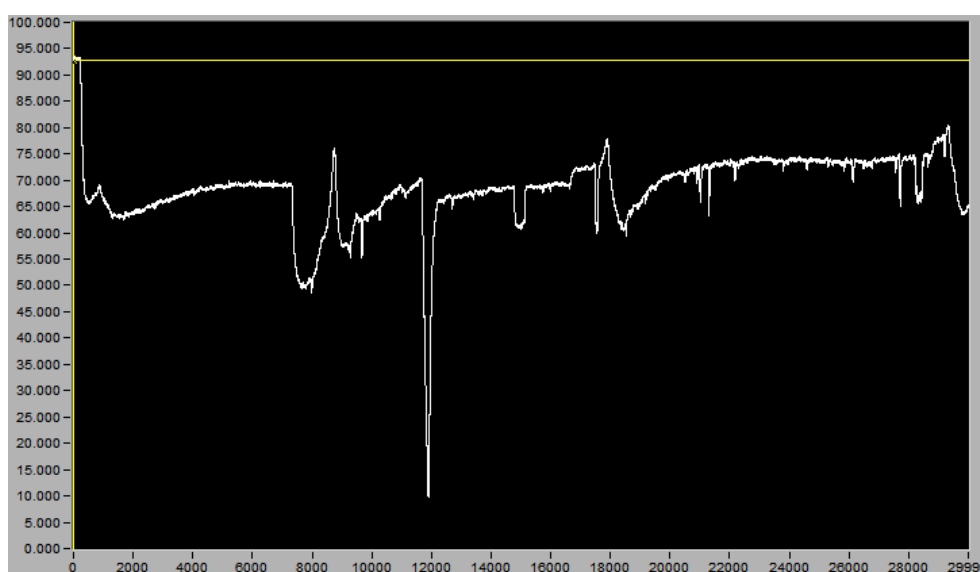


Figura 4.28 - Perfil de DO obtido no ensaio DO 2

De forma a resolver este problema voltaram-se a fazer todas as ligações dos cabos utilizados para a obtenção do sinal, tanto no controlador da sonda de DO como na placa de aquisição da *National Instruments*TM. Fixou-se ainda o cabo de ligação entre a placa e o computador para evitar que este se pudesse movimentar com algumas oscilações externas. Após a conclusão dos procedimentos referidos, o problema detetado não voltou a ocorrer.

Ensaio de 22 de novembro – DO 3

Na Figura 4.29 está representada uma parte do perfil de DO obtido neste ensaio. Mais uma vez, é importante ter em consideração que apenas estão representados os 3 primeiros pulsos deste ensaio.

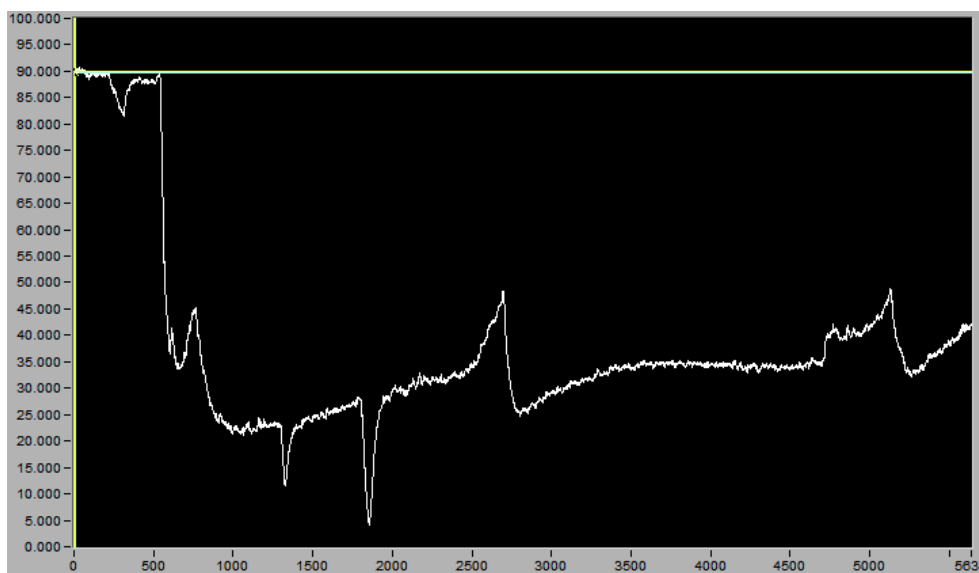


Figura 4.29 - Perfil de DO obtido no ensaio DO 3

Resolvidos os problemas de interferência eletromagnética ocorridos no ensaio anterior, optou-se por manter as condições de operação idênticas ao ensaio de 17 de novembro, foi adicionado um volume de 4,4 litros por pulso e o valor de *setpoint* do DO foi mantido a 75%. Assim, os parâmetros introduzidos no programa foram de acordo com os representados na Tabela 4.59.

Tabela 4.59 - Parâmetros aplicados no programa na acumulação DO 3

Parâmetros	Valor
N_p, média	120
T_{Contador} (s)	0
D_{sp}	0,01
DO_{sp}	75%
T_{BombaLigada} (s)	290,4
T_{BombaDesligada} (s)	290,4

Este ensaio começou às 10:51h e acabou às 15:52h, tendo durado 5,02 horas. Adicionou-se um total de 4 pulsos, equivalendo a 17,6 litros de substrato. Na Figura 4.30 é possível observar as progressões do tempo de consumo dos pulsos e da quantidade de PHA por litro de reator e, novamente, os perfis obtidos demonstram que o tempo de consumo dos pulsos aumenta com a quantidade de PHA já acumulada. É curioso notar que no 4º pulso o aumento do tempo de consumo é superior aos anteriores, algo que aconteceu também no ensaio de 17 de novembro.

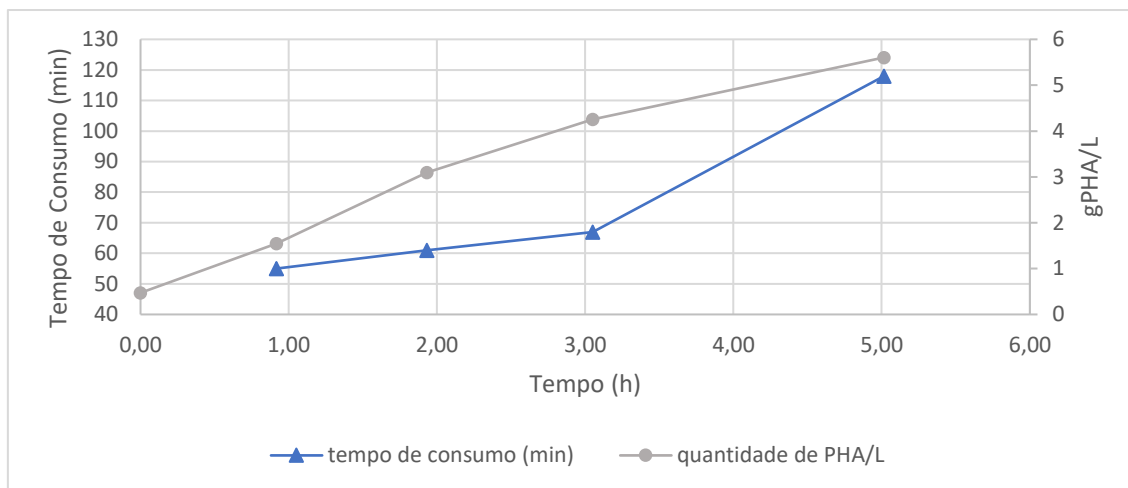


Figura 4.30 - Tempo de consumo dos pulsos e quantidade de PHA por litro de reator do ensaio DO 3

Na Figura 4.31 estão representados os valores de DO mínimo e máximo, bem como os declives de cada pulso. Conclui-se que, analogamente ao ensaio DO 1, os valores de DO mínimo têm uma tendência crescente ao longo do tempo de acumulação e que o declive no momento da adição de um novo pulso tem uma tendência oposta, decrescendo com o tempo. Observa-se ainda que neste ensaio o valor de D_{sp} foi suficiente para a alimentação automática de todos os pulsos, no entanto, o declive do último pulso já se aproximou, deixando uma margem de apenas 20% para o valor estabelecido, assim, se se pretendesse continuar o ensaio para além dos 4 pulsos poderia ser necessário reduzir o valor do *setpoint* do declive.

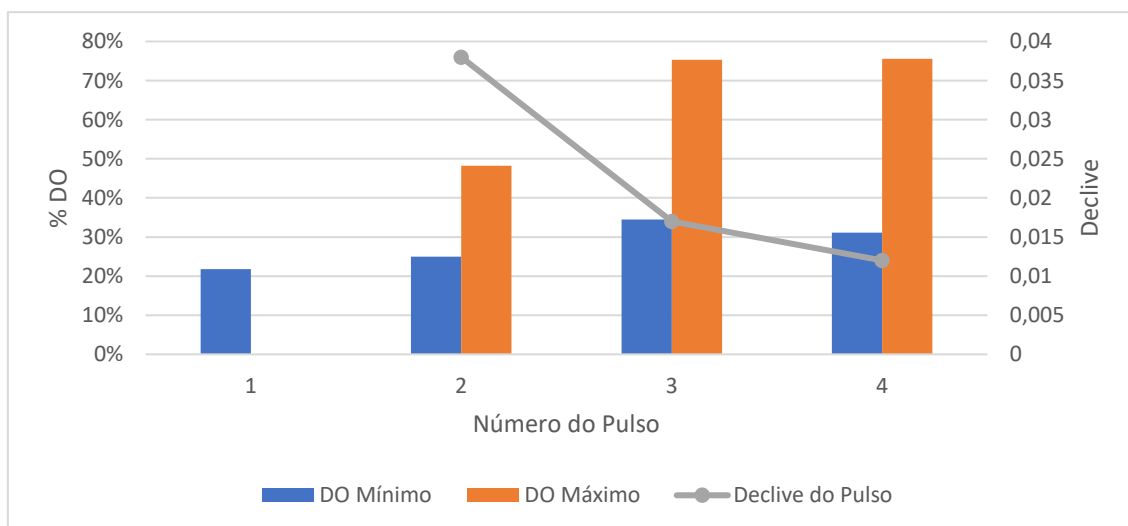


Figura 4.31 - Valores de DO e declives dos pulsos do ensaio DO 3

Quanto à quantidade de PHA e à % de PHA obtidas neste processo, representadas na Tabela 4.60, conclui-se que no final da acumulação tinham sido armazenadas 283,6 gramas de PHA pela cultura, menos 13 gramas do que no ensaio de 17 de novembro. Seria de esperar uma diferença maior, tendo em conta que foi introduzido menos um pulso, o que poderá indicar um erro na quantificação da quantidade de PHA deste último ensaio. Observando a % de PHA nota-se que no último pulso existe um salto superior ao esperado, corroborando a hipótese da existência de um erro de quantificação.

Tabela 4.60 - Resumo da quantidade de PHA produzida no ensaio DO 3

Pulso	Tempo Cumulativo (horas)	% Tempo de Acumulação	Quantidade de PHA (g)	%PHA	% de PHA Total Produzido
0	0,00	0%	15,6	12%	0%
1	0,92	18%	57,7	33%	16%
2	1,90	39%	129,3	54%	42%
3	3,05	61%	196,5	58%	67%
4	5,02	100%	283,6	72%	100%

Na Tabela 4.61 estão representadas as características do polímero obtido e observa-se a tendência dos ensaios anteriores obtendo-se uma percentagem de 81% do monómero HB na composição do PHA final.

Tabela 4.61 - Características do polímero produzido no ensaio DO 3

Quantidade Produzida (g)	% HB	% HV	Quantidade de HB Produzida (g)	Quantidade de HV Produzida (g)
268,1	81%	19%	217,1	50,9

Na Tabela 4.62 apresentam-se as produtividades volumétricas observadas neste ensaio. Conclui-se que a produtividade volumétrica média foi de 1,06 gPHA por litro de reator por hora e que a produtividade volumétrica máxima representa cerca de 2 vezes a final.

Tabela 4.62 - Produtividades volumétricas do ensaio DO 3

Pulso	Tempo de Consumo (horas)	PHA Produzido (g)	Produtividade Volumétrica (gPHA/L.h)	Produtividade Volumétrica Média (gPHA/L.h)
1	0,92	42	1,23	1,06
2	1,02	114	1,68	
3	1,12	181	1,30	
4	1,97	268	0,88	

Utilizando as mesmas condições de operação deste ensaio, seria possível fazer 4,8 *batch* de produção por dia. Assim, a capacidade de produção anual será de 534 kg de PHA.

No referente às produtividades específicas, observa-se na Tabela 4.63 a tendência decrescente esperada. O valor de produtividade específica média também está de acordo com o previsto, apesar de ser superior à média dos ensaios do 1º algoritmo. Observou-se uma produtividade específica média de 0,45 gPHA por grama de biomassa ativa por hora e que o valor de produtividade específica máximo foi 2 vezes superior à produtividade específica final.

Tabela 4.63 - Produtividades específicas do ensaio DO 3

Pulso	Produtividade Específica (gPHA/gXA.h)	Produtividade Específica Média (gPHA/gXA.h)
1	0,48	0,45
2	0,83	
3	0,56	
4	0,39	

De forma a iniciar o estudo sobre os VFA neste ensaio apresenta-se a Tabela 4.64, onde está representada a concentração do substrato e o volume total adicionado. Observa-se que a concentração se enquadra na gama das obtidas nos ensaios apresentados até ao momento.

Tabela 4.64 - Concentração do substrato utilizado e volumes adicionados no ensaio DO 3

Concentração (gCQO/L)	Volume de Pulso (L)	Volume Adicionado (L)	Quantidade Adicionada (gCQO)
25,6	4,4	17,6	445,0

Na Tabela 4.65, onde se representa a composição do substrato utilizado, comparativamente ao ensaio anterior nota-se que esta variou, aproximando-se das composições encontradas nos ensaios anteriores.

Tabela 4.65 - Composição do substrato alimentado no ensaio DO 3

Ácido Láctico	Ácido Acético	Ácido Propiónico	Etanol	Ácido Butírico	Ácido Valérico
0%	20%	5%	8%	62%	5%

Na Figura 4.32 estão representadas as quantidades adicionadas e consumidas para cada um dos VFA alimentados ao reator. Em primeiro lugar conclui-se que foram consumidos 88% dos ácidos alimentados. Em segundo lugar observa-se que, como seria espectável, o ácido butírico e o ácido valérico foram consumidos preferencialmente, 92% e 95% respetivamente. Note-se que este foi dos poucos ensaios em que a percentagem de consumo do ácido valérico foi superior à do ácido butírico.

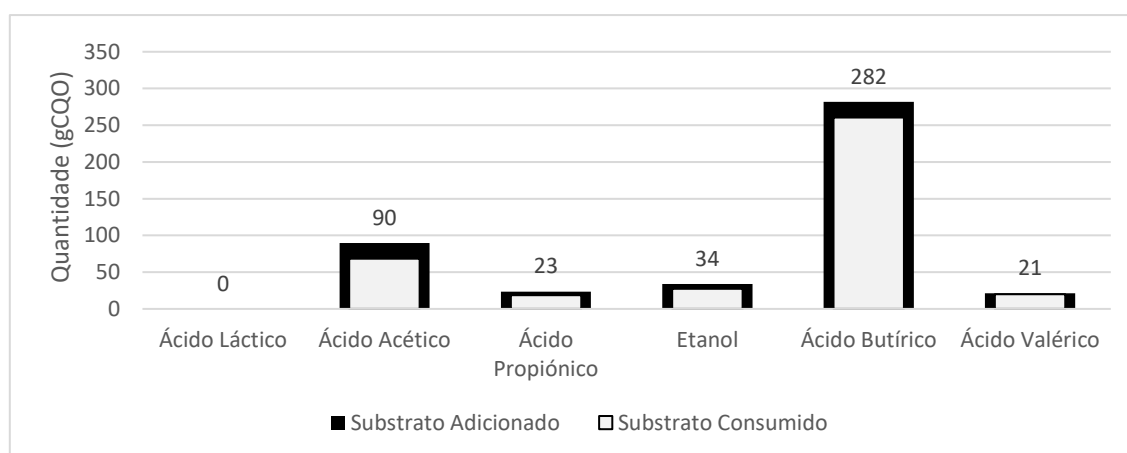


Figura 4.32 - Quantidade de VFA adicionada e consumida no ensaio DO 3

Para terminar, na Tabela 4.66 estão representadas as velocidades de consumo médias para cada VFA adicionado neste ensaio.

Tabela 4.66 - Velocidades de consumo dos VFA alimentados no ensaio DO 3

VFA	Ácido Lático	Ácido Acético	Ácido Propiónico	Etanol	Ácido Butírico	Ácido Valérico
Velocidade de Consumo Média (gCQO/h)	0	13,60	3,75	5,47	51,88	3,99

Ensaio de 29 de novembro – DO 4

Na Figura 4.33 está representada uma fração do sinal obtido no ensaio de 29 de novembro. Os pulsos observáveis são os últimos 2 dados neste processo.

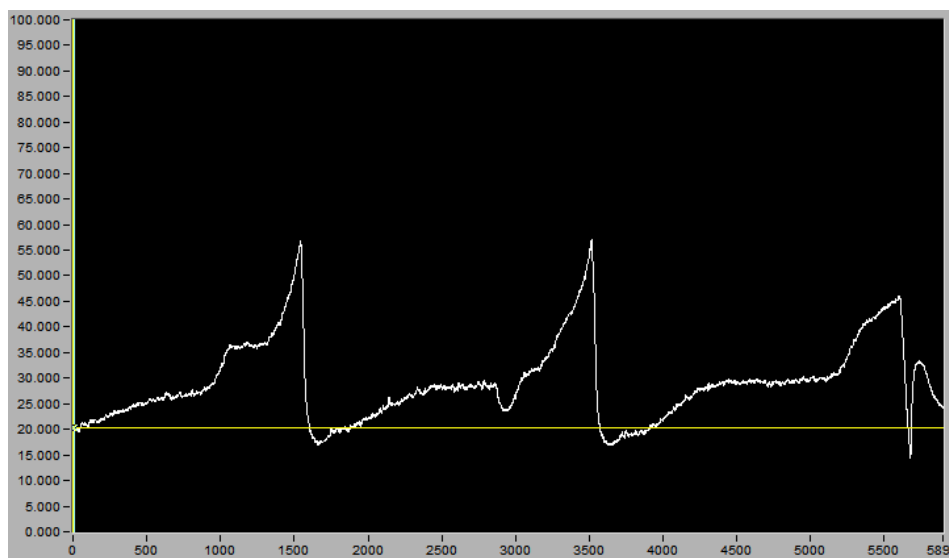


Figura 4.33 - Perfil de DO obtido no ensaio DO 4

De forma a diferenciar este ensaio dos anteriores optou-se por alterar o volume dos pulsos adicionados e o *setpoint* do declive. Os parâmetros introduzidos no programa estão representados na Tabela 4.67.

Tabela 4.67 - Parâmetros aplicados no programa na acumulação DO 4

Parâmetros	Valor
N_p, média	120
T_{Contador} (s)	0
D_{sp}	0,01
DO_{sp}	57%
T_{BombaLigada} (s)	145,2
T_{BombaDesligada} (s)	145,2

A Equação 21 demonstra o cálculo efetuado para definir o volume dos pulsos dados neste ensaio.

$$V_{pulso} = \frac{V_{purga} \times V_{feast (SBR)}}{V_{SBR}} = \frac{1}{2} \times \frac{25 L \times 17,58 L}{100 L} = 2,2 L$$

Equação 21 - Cálculo do Volume de um pulso equivalente a ½ do ciclo do SBR

Seguindo a metodologia utilizada até ao momento, depois de definido o volume necessário de alimentar por pulso, calculou-se então o tempo que a bomba deveria ser ativada de forma a serem alimentados 2,2 L. Para tal, utilizaram-se os valores de calibração da bomba e o volume do pulso, segundo a Equação 22.

$$t_{Bomba Ligada} = \frac{V_{pulso} \times t_{calibração}}{V_{calibração}} = \frac{2,2 L \times 66 s}{1 L} = 145,2 s$$

Equação 22 - Cálculo do tempo de bomba ligada para os ensaios do 2º algoritmo de um pulso equivalente a ½ do ciclo do SBR

Este ensaio começou às 10:03h e terminou às 14:27h, tendo durado 4,40 horas. Adicionaram-se 6 pulsos e um total de 13,2 litros. Na Figura 4.34 estão representados, novamente, os perfis do tempo de consumo dos pulsos dados e da quantidade de PHA por litro de reator e observa-se que, neste ensaio, apesar do tempo de consumo aumentar ao longo do tempo de acumulação, como seria de esperar, no 3º e 4º pulsos é onde ocorre a maior subida.

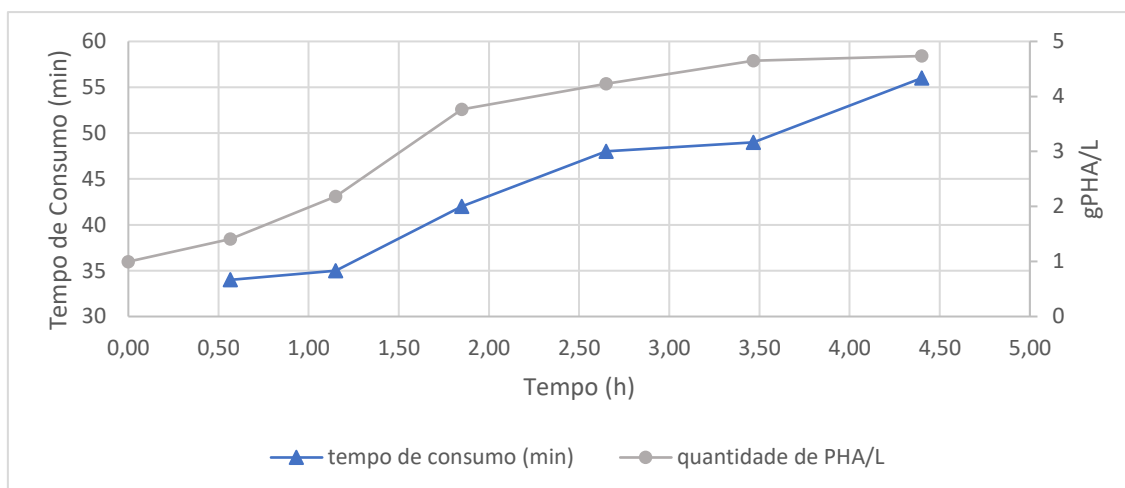


Figura 4.34 - Tempo de consumo dos pulsos e quantidade de PHA por litro de reator do ensaio DO 4

Observando a Figura 4.35, onde estão representados os valores correspondentes ao controlo do sinal de DO, conclui-se que todos os pulsos alimentaram automaticamente e no momento pretendido. De referir que os valores do declive alteram de forma considerável de ensaio para ensaio, tornando difícil prever qual será a gama de valores do mesmo antes de se iniciar um ensaio, no entanto, a tendência decrescente deste parâmetro parece ser transversal ao conjunto dos ensaios. Assim, é recomendável que, após o acionamento do 2º pulso, o utilizador confira o valor de declive no momento prévio à adição e se este for demasiado próximo ao valor de *setpoint* definido este parâmetro deverá ser corrigido para um valor inferior ao atribuído inicialmente.

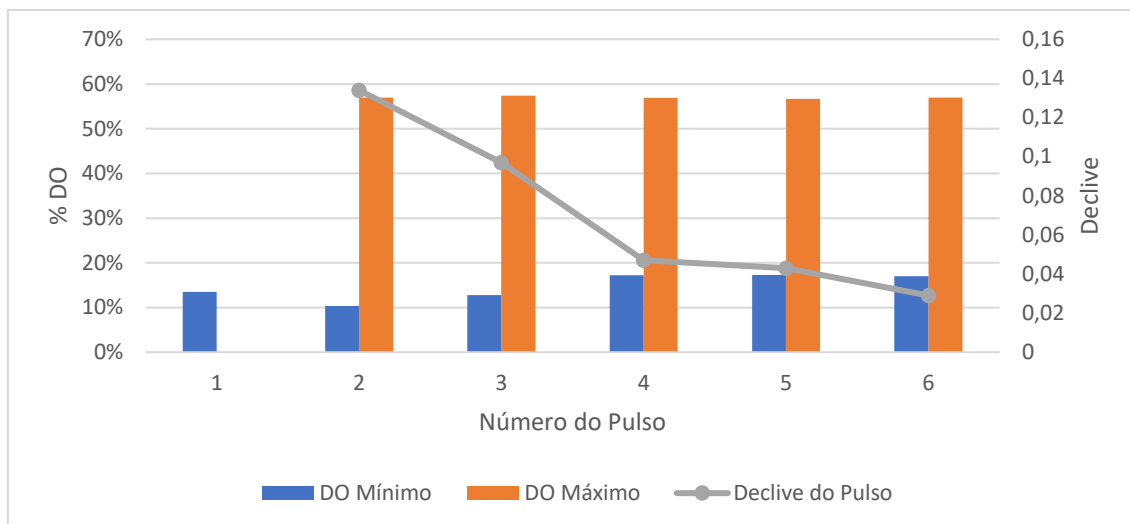


Figura 4.35 - Valores de DO e declives dos pulsos do ensaio DO 4

Na Tabela 4.68 estão representados alguns valores relacionados com a quantidade de PHA obtida neste ensaio. Observa-se uma % de PHA no final de 60% e ao atingir-se 42% do tempo total da acumulação, já se tinha produzido 63% do PHA acumulado. Estes resultados afiguram-se na mesma linha dos ensaios anteriores, explicitando alguns padrões ao longo dos mesmos, ainda que as condições de operação sejam diferentes.

Tabela 4.68 - Resumo da quantidade de PHA produzida no ensaio DO 4

Pulso	Tempo Cumulativo (horas)	% Tempo de Acumulação	Quantidade de PHA (g)	%PHA	% PHA Total Produzido
0	0,00	0%	32,9	19%	0%
1	0,57	13%	49,7	24%	9%
2	1,20	26%	81,6	34%	26%
3	1,85	42%	149,2	45%	63%
4	2,65	60%	176,8	55%	77%
5	3,47	79%	204,4	58%	92%
6	4,40	100%	218,7	60%	100%

Observando a Tabela 4.69 conclui-se que, neste ensaio, a quantidade de PHA produzida foi de 186 gramas, valor esse inferior à média da quantidade produzida nos ensaios descritos até ao momento, 259 gramas. Esse facto poderá significar que este ensaio foi terminado demasiado cedo.

Tabela 4.69 - Características do polímero produzido no ensaio DO 4

Quantidade Produzida (g)	% HB	% HV	Quantidade de HB Produzida (g)	Quantidade de HV Produzida (g)
185,8	80%	20%	198,6	49,7

Na Tabela 4.70 estão representados os resultados de produtividade volumétrica obtidos neste ensaio. Observa-se uma produtividade volumétrica média de 0,91 gPHA por litro

de reator por hora, onde a produtividade volumétrica máxima representa 7 vezes o valor da final observada.

Tabela 4.70 - Produtividades volumétricas do ensaio DO 4

Pulso	Tempo de Consumo (horas)	PHA Produzido (g)	Produtividade Volumétrica (gPHA/L.h)	Produtividade Volumétrica Média (gPHA/L.h)
1	0,57	17	0,84	0,91
2	0,58	49	1,46	
3	0,70	116	2,44	
4	0,80	144	0,83	
5	0,82	172	0,77	
6	0,93	186	0,33	

Considerando que este ensaio foi o menos prolongado de todos os efetuados nesta dissertação, perspetivando um sistema de produção de 24 horas seria possível efetuar 5,5 *batch* nesse período. Assim, a capacidade de produção anual deste ensaio é de 459 kg de PHA.

Na Tabela 4.71, onde estão representadas as produtividades específicas, observa-se que a produtividade específica média é idêntica à média das produtividades específicas anteriores. Em comparação com o ensaio DO 3 conclui-se que este valor se aproxima mais do esperado, pois, tentou-se manter a cultura estável ao longo dos ensaios, ainda assim, ao longo dos mesmos notou-se alguma variação nos valores de concentração celular. Observou-se uma produtividade específica média de 0,35 gPHA por grama de biomassa ativa por hora e que o valor da produtividade específica máxima foi 6 vezes superior à produtividade específica final.

Tabela 4.71 - Produtividades específicas do ensaio DO 4

Pulso	Produtividade Específica (gPHA/gXA.h)	Produtividade Específica Média (gPHA/gXA.h)
1	0,25	0,35
2	0,46	
3	0,81	
4	0,29	
5	0,28	
6	0,13	

Na Tabela 4.72 observa-se que, como já referido anteriormente, este foi o ensaio em que se adicionou menos substrato, logo dever-se-ia ter continuado a alimentar pulsos em vez de se optar por terminar o processo precocemente. Ainda assim a % PHA obtida permite uma extração rentável do polímero produzido.

Tabela 4.72 - Concentração do substrato utilizado e volumes adicionados no ensaio DO 4

Concentração (gCQO/L)	Volume de Pulso (L)	Volume Adicionado (L)	Quantidade Adicionada (gCQO)
21,0	2,2	13,2	276,6

Observa-se, na Tabela 4.73, que a composição do substrato utilizado neste ensaio não difere muito das composições dos ensaios anteriores.

Tabela 4.73 - Composição do substrato alimentado no ensaio DO 4

Ácido Lático	Ácido Acético	Ácido Propiónico	Etanol	Ácido Butírico	Ácido Valérico
0%	22%	5%	8%	61%	4%

Observando a Figura 4.36, que representa as quantidades de VFA adicionadas e consumidas por tipo de ácido, conclui-se que foram consumidos 94% dos VFA alimentados neste ensaio e observa-se um consumo quase total dos ácidos butírico e valérico.

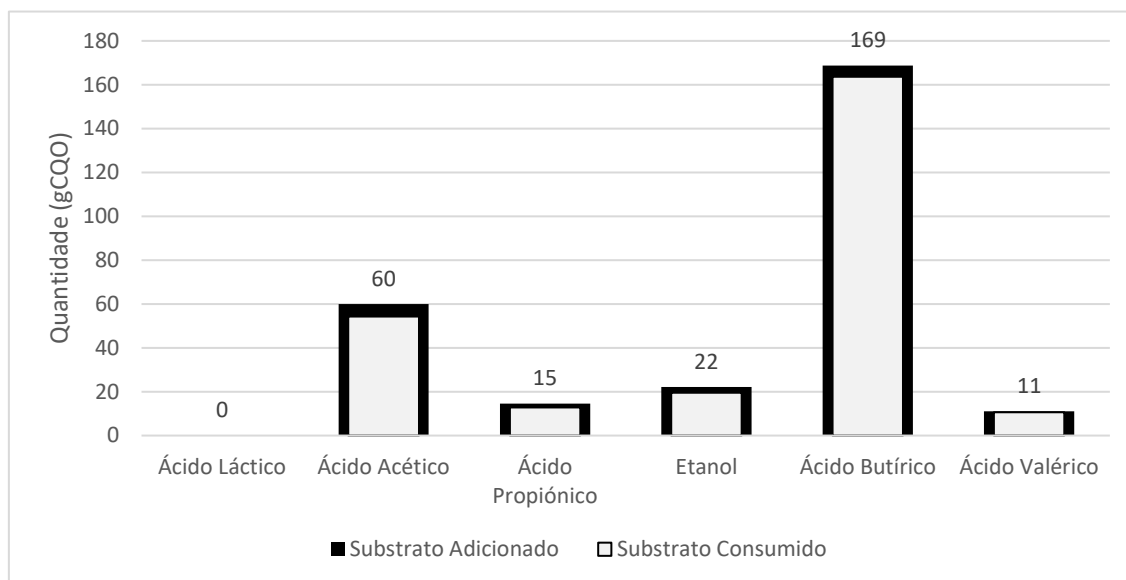


Figura 4.36 - Quantidade de VFA adicionada e consumida no ensaio DO 4

Para terminar a descrição do ensaio de 29 de novembro efetuou-se o cálculo das velocidades de consumo médias de cada ácido, representadas na Tabela 4.74. Observa-se, na linha dos ensaios anteriores, que a velocidade de consumo do ácido butírico é consideravelmente superior à dos restantes VFA.

Tabela 4.74 - Velocidades de consumo médias dos VFA adicionados no ensaio DO 4

VFA	Ácido Lático	Ácido Acético	Ácido Propiónico	Etanol	Ácido Butírico	Ácido Valérico
Velocidade de Consumo Média (gCQO/h)	0,0	13,7	3,2	4,9	41,4	2,7

Ensaio de 30 de novembro – DO 5

Para iniciar a descrição do ensaio de 30 de novembro apresenta-se o perfil de DO obtido neste dia, Figura 4.37. Mais uma vez, não está representada a totalidade do perfil, mas apenas os primeiros 8 pulsos.

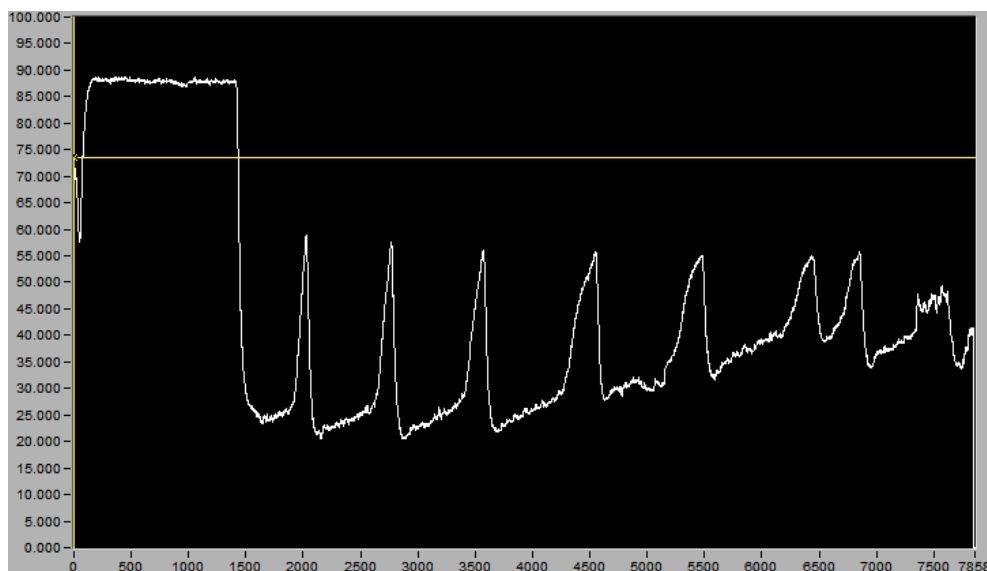


Figura 4.37 - Perfil de DO obtido no ensaio DO 5

Considerando que no ensaio anterior se alimentou apenas 62% da média de todos os ensaios efetuados, optou-se por repetir o volume do pulso dado. Assim o volume do pulso foi de 2,2 litros equivalendo a $\frac{1}{2}$ do volume alimentado num ciclo do reator SBR.

Na Tabela 4.75 estão representados os parâmetros introduzidos no programa no início do processo e observa-se que o único diferente é o *setpoint* do DO que foi aumentado para 60%.

Tabela 4.75 - Parâmetros aplicados no programa na acumulação DO 5

Parâmetros	Valor
Np, média	120
T_{Contador} (s)	0
D_{sp}	0,01
DO_{sp}	60%
T_{BombaLigada} (s)	145,2
T_{BombaDesligada} (s)	145,2

O ensaio começou às 9:47h e terminou às 15:09h, tendo durando 5,37 horas. Adicionou-se um total de 14 pulsos equivalendo a 27,5 litros. Na Figura 4.38 estão representados os perfis do tempo de consumo dos pulsos e da quantidade de PHA por litro de reator. Observa-se que existem alguns pulsos que não se enquadram na tendência esperada, o 7º, o 9º e 10º pulsos apresentam tempos de consumo cerca de 50% inferiores à média dos restantes. Esses valores devem-se à existência de um atrofiamiento da tubagem de alimentação fazendo com que os pulsos não fossem alimentados na totalidade. Estima-se que se tenha alimentado apenas 1 litro por cada um destes pulsos anómalos.

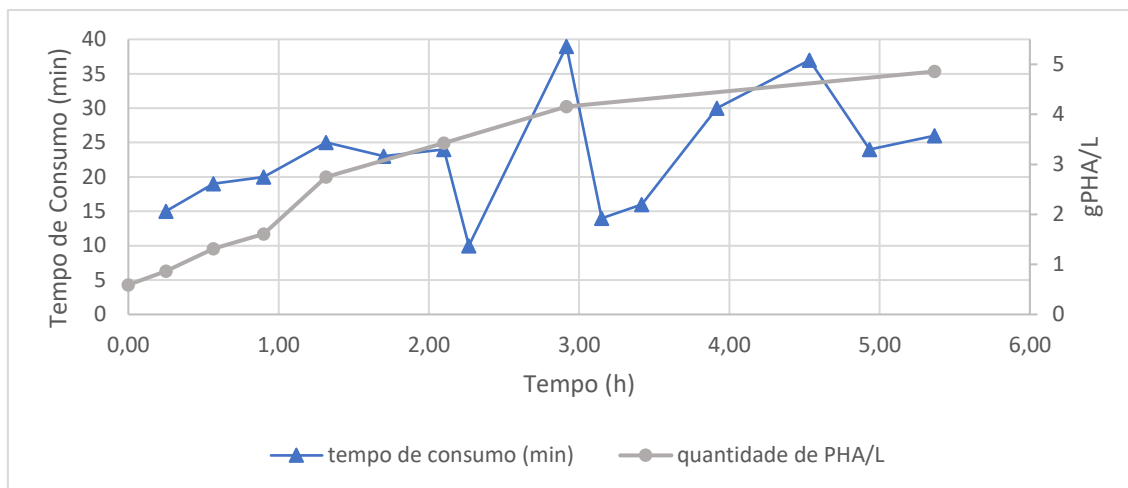


Figura 4.38 - Tempo de consumo dos pulsos e quantidade de PHA por litro de reator do ensaio DO 5

Na Figura 4.39 estão representados os valores relacionados com o controlo associado ao sinal de DO e, em primeiro lugar conclui-se que ambos os valores de *setpoint* foram cumpridos em todos os casos, logo os pulsos foram acionados automaticamente ao longo de todo o processo. Em segundo lugar, observa-se a tendência maioritariamente crescente no valor de DO mínimo atingido em cada pulso. É importante referir que até ao 7º pulso a tendência crescente é constante e que depois desse pulso os valores de DO mínimo oscilam um pouco para valores fora da tendência esperada. Tal facto poderá ser explicado pela anomalia na alimentação de 3 dos pulsos alimentados, que possivelmente terá levado a uma reação inesperada por parte da cultura.

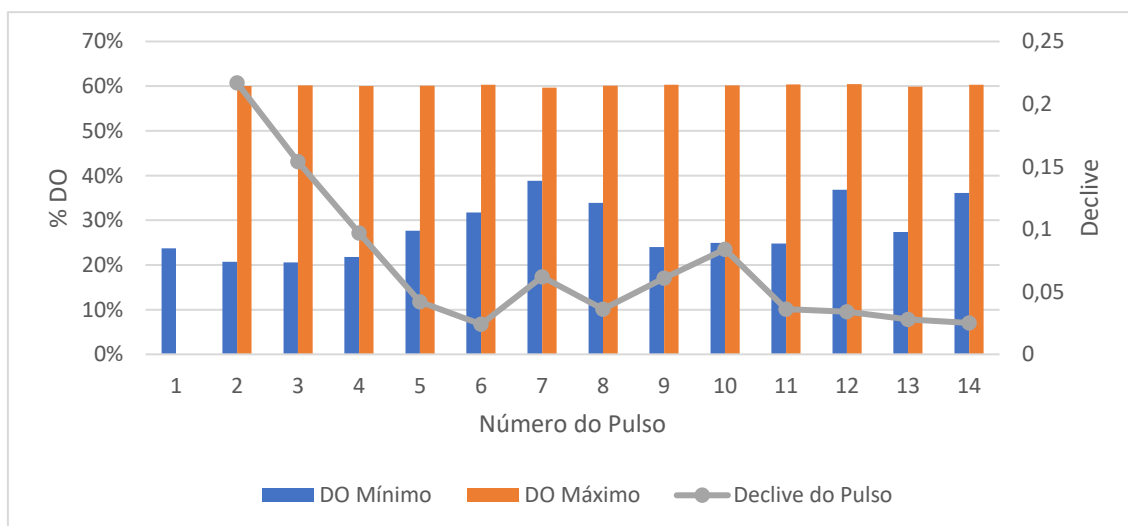


Figura 4.39 - Valores de DO e declives dos pulsos do ensaio DO 5

Após o estudo das quantidades de PHA obtidas, representado na Tabela 4.76, observa-se uma % de PHA final de 62% e que em 54% do tempo total da acumulação já se tinha produzido 70% do PHA total.

Tabela 4.76 - Resumo da quantidade de PHA produzida no ensaio DO 5

Pulso	Tempo Cumulativo (horas)	% Tempo de Acumulação	Quantidade de PHA (g)	%PHA	% PHA Total Produzido
0	0	0%	19,5	18%	0%
1	0,25	5%	30,5	26%	4%
2	0,57	11%	49,1	30%	11%
3	0,90	17%	63,8	37%	16%
4	1,32	25%	115,0	46%	35%
6	2,10	39%	158,3	52%	51%
8	2,92	54%	210,3	56%	70%
14	5,37	100%	293,9	62%	100%

Na Tabela 4.77 estão representadas as características do polímero obtido neste ensaio. Observa-se uma produção total de 274 gramas e uma percentagem do monómero HB de 76%.

Tabela 4.77 - Características do polímero produzido no ensaio DO 5

Quantidade Produzida (g)	% HB	% HV	Quantidade de HB Produzida (g)	Quantidade de HV Produzida (g)
274,4	76%	24%	208,5	65,8

Quanto às produtividades volumétricas deste ensaio, Tabela 4.78, observa-se a produtividade volumétrica média é prejudicada pela fase final do processo, onde a quantidade de PHA produzido por hora baixou consideravelmente. A produtividade volumétrica máxima representa cerca de 5 vezes o valor da produtividade final.

Tabela 4.78 - Produtividades volumétricas do ensaio DO 5

Pulso	Tempo de Consumo (horas)	PHA Produzido (g)	Produtividade Volumétrica (gPHA/L.h)	Produtividade Volumétrica Média (gPHA/L.h)
1	0,25	11	1,25	0,84
2	0,57	30	1,57	
3	0,90	44	1,11	
4	1,32	95	2,94	
6	2,10	139	1,20	
8	2,92	191	1,26	
14	5,37	274	0,56	

Estudou-se, ainda, a capacidade de produção anual de um processo com as mesmas características que o presente. Considerando o tempo total desta acumulação conclui-se que seria possível produzir 4,5 *batch* diário, o que ao final do ano perfaz uma quantidade total de 423 kg de PHA produzido.

Na Tabela 4.79 estão representados os valores das produtividades específicas obtidos no ensaio de 30 de novembro. Em primeiro lugar observa-se que a produtividade específica

média foi de 0,43 gPHA por grama de biomassa ativa por hora e, em segundo lugar, observa-se que o valor de produtividade específica máximo equivale a 2 vezes o valor da produtividade específica final.

Tabela 4.79 - Produtividades específicas do ensaio DO 5

Pulso	Produtividade Específica (gPHA/gXA.h)	Produtividade Específica Média (gPHA/gXA.h)
2	0,44	0,43
4	0,75	
6	0,47	
9	0,43	
14	0,32	

Na Tabela 4.80 observa-se a concentração do substrato utilizado neste ensaio, bem como a quantidade total de VFA adicionada.

Tabela 4.80 - Concentração do substrato utilizado e volumes adicionados no ensaio DO 5

Concentração (gCQO/L)	Volume de Pulso (L)	Volume Adicionado (L)	Quantidade Adicionada (gCQO)
19,5	2,2	27,5	535,1

Em relação à composição do substrato utilizado, representada na Tabela 4.81, observa-se pela primeira vez a presença de ácido láctico, em pequena quantidade, contudo, no geral, este substrato não difere substancialmente dos utilizados na maioria dos ensaios anteriores.

Tabela 4.81 - Composição do substrato alimentado no ensaio DO 5

Ácido Láctico	Ácido Acético	Ácido Propiónico	Etanol	Ácido Butírico	Ácido Valérico
1%	21%	5%	7%	62%	4%

Relativamente ao consumo dos ácidos alimentados, representado na Figura 4.40, conclui-se que neste processo houve 85% de aproveitamento do total alimentado. Observa-se que 94% do ácido butírico e que 82% do ácido valérico foram consumidos, comprovando, novamente, que dos VFA alimentados ao longo desta dissertação estes são considerados os preferenciais. Observa-se ainda que do pouco ácido láctico alimentado, apenas 42% foi consumido pela biomassa.

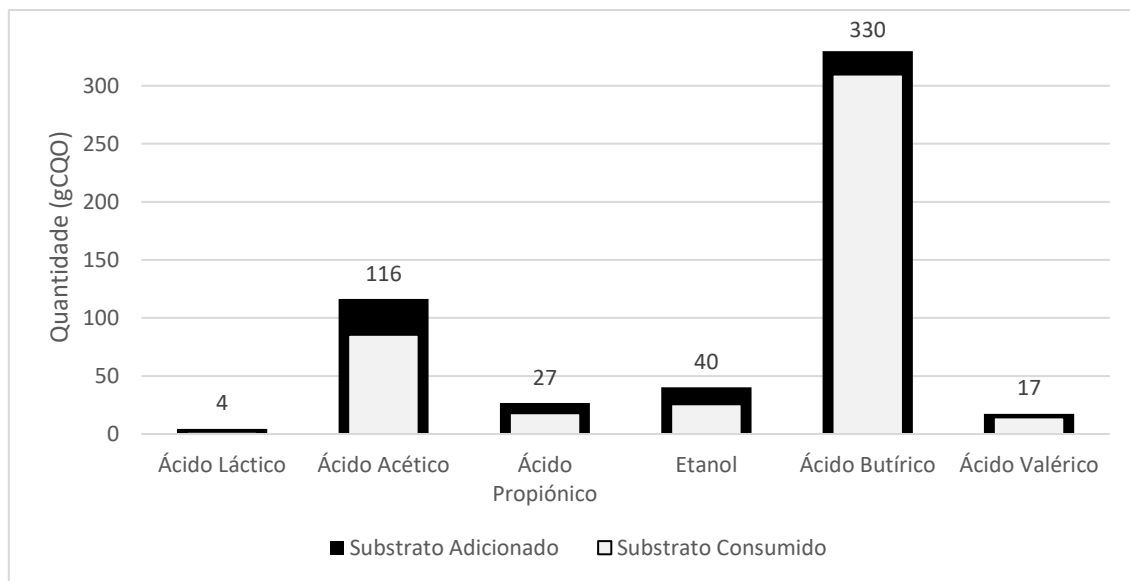


Figura 4.40 - Quantidade de VFA adicionada e consumida no ensaio DO 5

Para terminar a seção de descrição dos ensaios realizados, calcularam-se as velocidades de consumo dos ácidos alimentados ao reator, representadas na Tabela 4.82. Observa-se que a velocidade de consumo do ácido butírico foi, novamente, superior à dos restantes ácidos. Em relação à velocidade de consumo do ácido valérico, o ácido butírico foi consumido 22 vezes mais rápido.

Tabela 4.82 - Velocidades de consumo médias dos VFA adicionados no ensaio DO 5

VFA	Ácido Láctico	Ácido Acético	Ácido Propiónico	Etanol	Ácido Butírico	Ácido Valérico
Velocidade de Consumo Média (gCQO/h)	0,4	15,9	3,4	4,8	57,7	2,7

4.2.4 2º Algoritmo: Resumo dos Resultados

Terminada a descrição dos ensaios de produção à escala piloto que utilizaram como metodologia de controlo o algoritmo baseado na monitorização do DO, de forma análoga ao 1º algoritmo, procedeu-se a um breve resumo dos principais resultados obtidos. Na Tabela 4.83 estão representados os resultados mais relevantes retirados e conclui-se que o ensaio que obteve o melhor desempenho, relativamente à produtividade volumétrica foi o ensaio DO 3. Quanto ao total produzido observa-se que o melhor resultado foi obtido no ensaio DO 1. Observando a coluna de % VFA consumidos é possível concluir que o ensaio que obteve melhor aproveitamento foi o DO 4, todavia considera-se que os valores de todos os ensaios deste algoritmo são satisfatórios.

Tabela 4.83 - Resumo dos principais resultados dos ensaios de produção utilizando o 2º algoritmo

Nº do Ensaio	Produtividade Volumétrica Média (gPHA/L.h)	Produtividade Específica Média (gPHA/gXA.h)	Quantidade Produzida (g)	% PHA	% VFA Consumidos
DO 1	0,80	0,43	278,7	67%	90%
DO 2	-	-	-	-	-
DO 3	1,06	0,45	268,1	72%	88%
DO 4	0,91	0,35	185,8	60%	94%
DO 5	0,84	0,43	274,4	62%	85%

4.2.5 Comparações do Desempenho dos Ensaios Realizados

Este subcapítulo tem como objetivo fazer uma comparação de todos os ensaios realizados nesta dissertação. Serão comparados vários parâmetros de forma a tentar perceber qual o método de controlo e condições de operação que apresentam melhores resultados de uma forma global. Serão ainda comparados os valores de produtividade volumétrica média obtidos com os valores retirados do levantamento bibliográfico. Esta leitura deverá ser acompanhada pela observação dos valores apresentados na Tabela 4.84 e na Tabela 4.85. Nas tabelas referidas, os valores a negrito representam o melhor valor para o parâmetro em causa.

Número de Alterações aos Parâmetros de Controlo

Este parâmetro de avaliação ajuda a perceber o grau de autonomia dos algoritmos usados. Neste caso, observa-se que ao longo de todos os ensaios de produção que utilizaram o 2º algoritmo como método de controlo não foi necessário alterar os *setpoints* definidos no início do processo. Enquanto nos ensaios que usaram o 1º algoritmo foi necessário alterar o *setpoint* num total de 8 vezes, perfazendo uma média de cerca de 2 alterações por ensaio.

Pode-se, então, concluir que a nível de automação do processo o 2º algoritmo apresenta maior robustez e deverá ser preferencial em relação ao 1º algoritmo.

Quantidade de PHA Produzida e Tempo de Acumulação

A primeira análise efetuada em relação aos resultados de produção foi à quantidade de PHA produzido por ensaio, atendendo a que o objetivo principal do processo é a produção deste polímero. Obteve-se uma gama de valores entre as 186 g (ensaio DO 4) e as 279 g (ensaio DO 1) com uma média de 253 g. Relativamente às médias de produção por método de controlo observa-se que ambos os valores são muito próximos, utilizando o 1º algoritmo obteve-se uma média de produção 1% superior à do 2º algoritmo. É importante ter presente que a produção de PHA num ensaio, por si só, não pode ser vista como um parâmetro de avaliação para o desempenho pois está, em parte, depende do tempo do processo, ou seja, se um processo demorar consideravelmente mais do que outro poderá atingir valores de produção também superiores. Releva-se que esta relação não é linear, algo que é observável nos valores obtidos nesta dissertação, como é possível observar na Figura 4.41. Por exemplo, o ensaio pH 1 foi o mais longo, tendo uma duração de 7,13 horas, no entanto a quantidade de PHA produzida no mesmo não foi a mais

elevada, tendo-se, pelo contrário, observado uma produção 3% inferior à média dos ensaios efetuados.

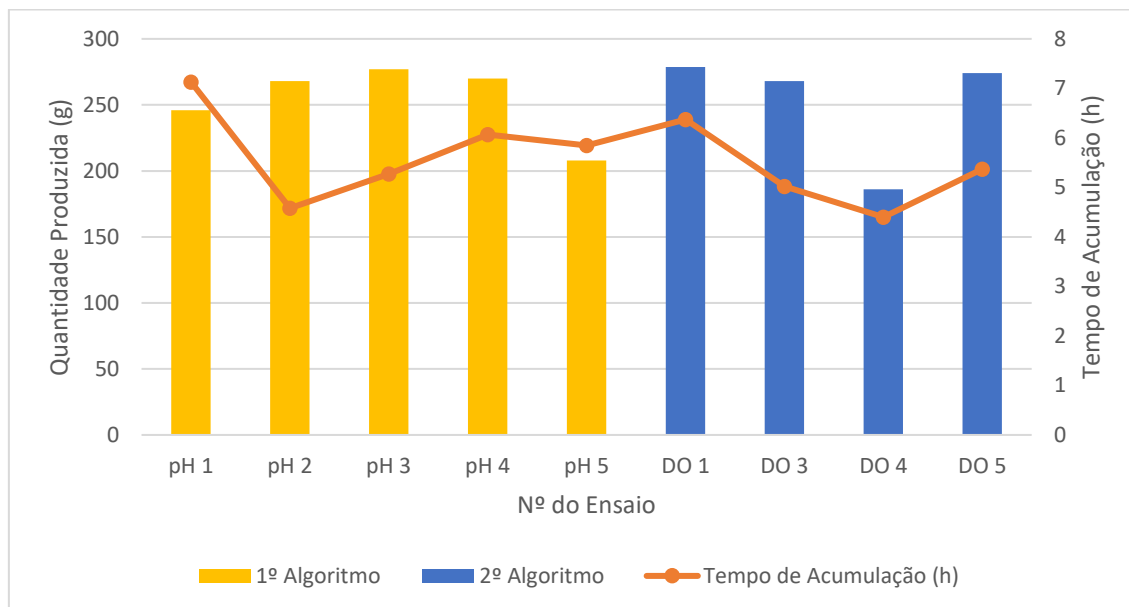


Figura 4.41 - Resumo da quantidade de PHA produzida e tempo de acumulação de todos os ensaios

Produtividade Volumétrica Média

Ao longo de todos os ensaios calcularam-se as produtividades volumétricas médias, pois este parâmetro relaciona 3 dos fatores mais importantes deste processo de produção: a quantidade produzida, o volume e o tempo total de acumulação. Observa-se na Figura 4.42 os resultados obtidos para todos ensaios realizados nesta dissertação. Comparando os diferentes valores obtidos é possível concluir que a maior produtividade volumétrica média foi a do ensaio DO 3, obtendo-se um valor 23% mais elevado do que na média de todos os ensaios, e que a menor ocorreu no ensaio pH 1, obtendo-se um valor equivalente a 75% da média global.

Comparando os valores dos 2 algoritmos testados, conclui-se que a média das produtividades volumétricas do 2º algoritmo é 15% superior à do 1º algoritmo, podendo-se, então, afirmar que neste capítulo o algoritmo de monitorização utilizando o DO como parâmetro de controlo é mais eficaz.

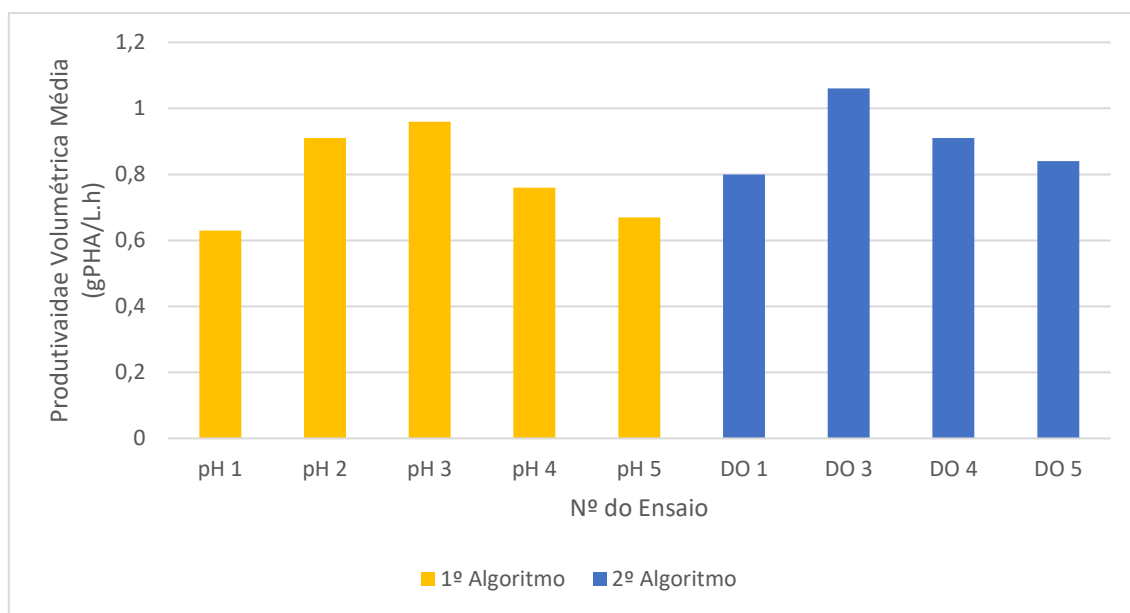


Figura 4.42 - Produtividades volumétricas médias dos ensaios realizados

Em relação aos valores retirados do levantamento bibliográfico para processos de produção que utilizam culturas puras, representados na Tabela 2.2, observa-se que a média dos ensaios realizados nesta dissertação representou 48% da média das produtividades volumétricas médias das culturas puras, mais especificamente, a média dos ensaios que utilizaram o 1º algoritmo representou 45% e os ensaios que utilizaram o 2º algoritmo 51%. Esta diferença é espectral, devido à maior complexidade do processo de produção através de MMC e ao substrato usado.

Quanto aos valores obtidos para ensaios de produção de PHA que utilizam MMC, representados na Tabela 2.3 (MMC utilizando substrato sintético) e na Tabela 2.4 (MMC utilizando substratos não sintéticos), observa-se que os métodos utilizados nesta dissertação obtiveram resultados cerca de 2 vezes superiores, demonstrando a eficácia dos sistemas de controlo aplicados.

Por último compararam-se os valores de cada um dos algoritmos com os valores retirados de trabalhos que utilizaram sistemas de controlo semelhantes. Em relação ao 1º algoritmo, confrontando com os valores da Tabela 2.6, conclui-se que os valores obtidos nesta dissertação são cerca de 5 vezes superiores e em relação ao 2º algoritmo, comparando com as produtividades volumétricas representadas na Tabela 2.7, os valores obtidos são cerca de 3 vezes superiores.

% PHA: Conteúdo Final de PHA (gPHA/gTSS)

Este parâmetro é de relevante importância na avaliação do desempenho de um processo de produção de PHA. Na fase de *downstream*, onde se verifica a extração e posterior purificação do polímero obtido, os custos do processo encarecem quanto menor for a % PHA na cultura.

Relativamente aos valores obtidos nos ensaios realizados, observa-se que o melhor resultado ocorreu no ensaio DO 3, onde esse valor foi 7% superior à média global. Verifica-se, ainda, que os valores de ambos os tipos de controlo possuem uma média

idêntica, facto que poderá levar à conclusão de que o tipo de controlo no reator de acumulação de um processo de produção utilizando MMC não têm grande influencia na % PHA final. A maior influência para este parâmetro deve-se às condições de operação na fase de seleção da biomassa no reator SBR e ao volume total de substrato adicionado.

Comparando os valores obtidos com os retirados do levantamento bibliográfico, observa-se que a média dos resultados desta dissertação foi 12% superior à média dos valores retirados da Tabela 2.3 e da Tabela 2.4. Considerando apenas os ensaios do 1º algoritmo e comparando com os valores da Tabela 2.6, onde se apresentam valores para ensaios de produção que utilizaram o pH como parâmetro de controlo, verifica-se uma diferença de 9 %, tendo-se obtido melhores resultados nos ensaios aqui efetuados. Quanto aos resultados do 2º algoritmo e comparando com a Tabela 2.7 observa-se que se obteve, de forma análoga à comparação anterior, melhores resultados nos ensaios realizados nesta dissertação, apresentando uma média 5% mais elevada.

Produtividade Específica Média

Este parâmetro relaciona-se com a capacidade da biomassa para produzir e armazenar PHA ao longo do tempo de uma acumulação. Tendo em conta que está intrinsecamente ligado à biomassa e que se tentaram manter as condições do reator de seleção estáveis ao longo destes ensaios, seria de esperar que este valor não alterasse consideravelmente de ensaio para ensaio. Observando na Tabela 4.84, os resultados obtidos de produtividade específica média é notório que este não permaneceu constante, no entanto a sua variação não é muito elevada. Obteve-se uma média de 0,38 gPHA por grama de biomassa ativa por hora e um desvio padrão do total da amostragem de 0,05.

Quantidade de VFA Alimentada e % de Consumo

No referente à quantidade de VFA adicionada por cada ensaio, representada na Figura 4.43, verifica-se que, como mencionado anteriormente, esta não foi constante, algo que dependeu não só do número de pulsos dados, como também da concentração do substrato.

A média global para este parâmetro foi de 449 gCQO por ensaio, onde o ensaio com maior quantidade adicionada foi o DO 5 apresentando um valor 19% superior à média. Observa-se ainda que no ensaio DO 3 a quantidade adicionada representou apenas 62% do valor da média global, justificando assim o facto de que neste ensaio se ter alimentado uma quantidade substancialmente inferior à dos restantes.

Relativamente à comparação deste parâmetro entre os 2 algoritmos estudados, observa-se na Tabela 4.85 que a quantidade média alimentada foi semelhante.

Na Figura 4.43 observa-se, ainda, a % dos VFA que foi consumida em cada ensaio. A média global deste parâmetro foi de 82%, ou seja, é possível concluir que, de uma forma geral, o aproveitamento dos VFA foi positivo. O ensaio que obteve melhor aproveitamento dos VFA alimentados foi o ensaio DO 4, no qual 94% dos ácidos alimentados foram consumidos.

Neste parâmetro constata-se uma diferença de 12 unidades percentuais entre os 2 algoritmos estudados, sendo que o 2º algoritmo apresentou melhores resultados. Este facto seria espectável tendo em conta a aplicabilidade dos parâmetros de controlo de cada algoritmo. No caso do algoritmo do pH, como já foi referido, o valor de pH_{sp} foi atribuído de acordo com um rácio entre o pH inicial e o pH que é atingido no 1º pulso, ou seja, apesar deste método ter funcionado relativamente bem ao longo dos ensaios, não se pode afirmar o *setpoint* atribuído em cada ensaio correspondesse ao momento em que se tinham esgotados os VFA alimentados no pulso anterior. Já no caso do 2º algoritmo, a súbita subida do valor de DO indica o momento em que já não existem praticamente VFA no meio.

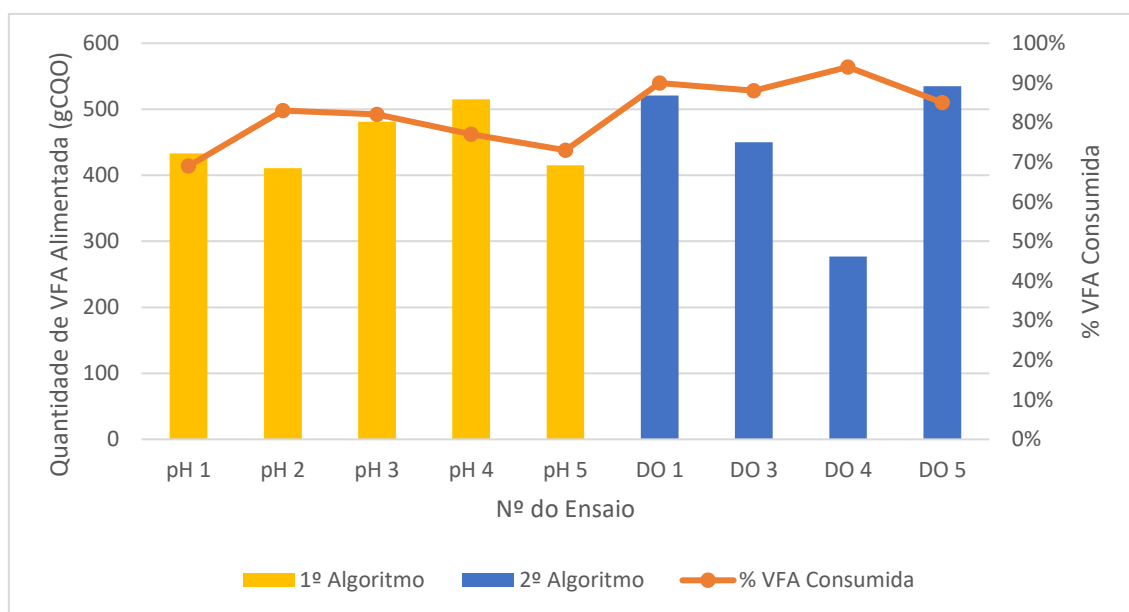


Figura 4.43 - Resumo das quantidades de VFA alimentadas e % de consumo para todos os ensaios

Capacidade de Produção Anual

De forma a relacionar a quantidade de PHA produzida com o tempo de duração do processo, estimou-se, para cada ensaio, uma capacidade de produção anual. Como já foi referido anteriormente, usou-se uma base de cálculo de 350 dias e 24 horas de trabalho diário e um volume de reator de 60 L. Numa primeira instância, observou-se que o ensaio com maior capacidade de produção anual foi o nº3, com uma capacidade máxima de produção de 534 kg por ano, e que o que apresentou pior capacidade foi o nº6. Em relação às médias de cada algoritmo observou-se uma produção média anual 15% superior utilizando o 2º algoritmo.

Quantidade Anual de VFA Necessária e Não Aproveitada

De forma análoga ao cálculo da capacidade de produção anual estimou-se a quantidade de VFA que seria necessário alimentar de forma a atingir essa meta de produção. Observa-se na Figura 4.44 que os valores obtidos para os diferentes algoritmos não são muito distintos, apresentando uma diferença de 6%. No entanto, a principal diferença está na quantidade de VFA que é realmente aproveitada pela cultura. Atendendo a que existe uma menor % de consumo quando se utiliza o algoritmo do pH, observa-se que a quantidade desperdiçada de VFA utilizando este algoritmo representa quase o dobro.

Conclui-se então que de forma a ter um melhor aproveitamento do substrato alimentado, reduzindo consequentemente os custos do processo, dever-se-á utilizar o 2º algoritmo.

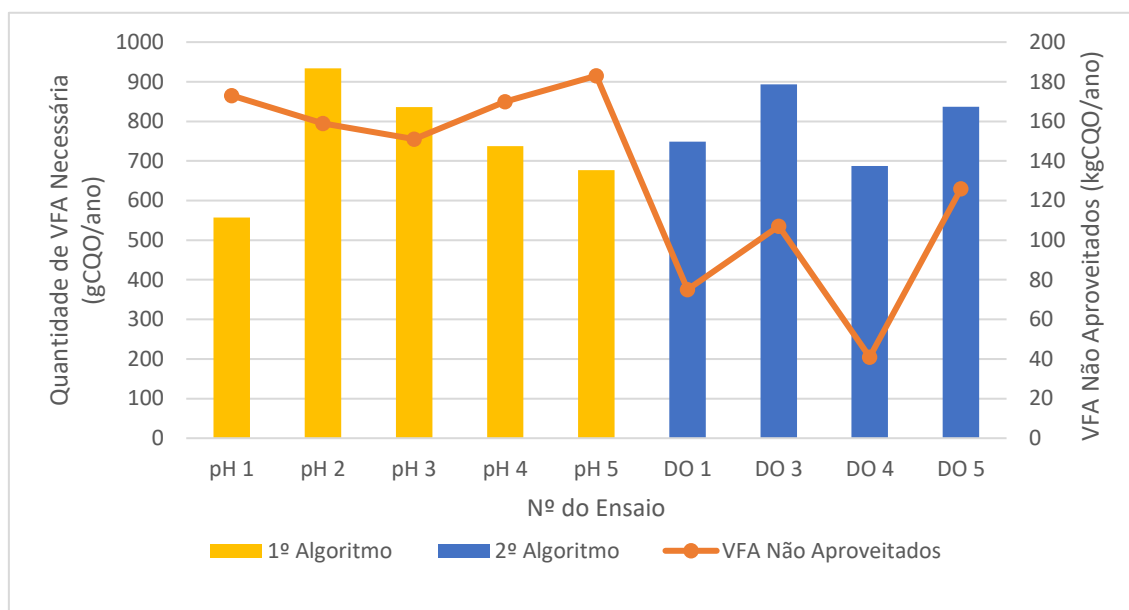


Figura 4.44 - Resumo da quantidade de VFA necessária e não aproveitada por ano

Rendimento de Conversão (gCQO PHA/gCQO VFA)

Para terminar esta análise comparativa calcularam-se os rendimentos de conversão de VFA para PHA dos ensaios realizados. Observa-se que a média global obtida foi de 0,79 gCQO PHA/gCQO VFA, valor esse 1,4 vezes superior à média dos valores retirados do levantamento bibliográfico, representados na Tabela 2.3 e na Tabela 2.4. Os ensaios do 2º algoritmo, mais uma vez, apresentaram um melhor desempenho com um rendimento médio de 0,82 gCQO PHA/gCQO VFA. Observa-se que este valor máximo se aproxima do valor máximo retirado da literatura de 0,85 gCQO PHA/gCQO VFA.

Tabela 4.84 - Resumo dos parâmetros de avaliação do desempenho dos ensaios realizados

Nº do Ensaio	DO 1	DO 3	DO 4	DO 5	pH 1	pH 2	pH 3	pH 4	pH 5
Parâmetro Monitorizado	DO				pH				
Tempo de Acumulação (h)	6,37	5,02	4,40	5,37	7,13	4,58	5,27	6,07	5,85
Nº de Pulsos	5	4	6	14	5	14	15	23	9
Nº de Alterações aos Parâmetros de Controlo	0	0	0	0	0	2	3	2	1
Quantidade de PHA Produzida (g)	279	268	186	274	246	268	277	270	208
% HB	82%	81%	80%	76%	79%	80%	80%	79%	77%
% PHA	67%	72%	60%	62%	71%	69%	64%	58%	61%
Produtividade Volumétrica Média (gPHA/L.h)	0,8	1,06	0,91	0,84	0,63	0,91	0,96	0,76	0,67
Produtividade Específica Média (gPHA/gXA.h)	0,43	0,45	0,35	0,43	0,34	0,41	0,38	0,32	0,34
Quantidade de VFA Adicionada (gCQO)	521	450	277	535	433	411	481	515	415
% VFA Consumida	90%	88%	94%	85%	69%	83%	82%	77%	73%
Capacidade de Produção Anual (kg)	403	534	459	423	318	459	484	383	338
Quantidade Anual de VFA Necessária (kgCQO)	749	893	687	837	557	934	836	737	677
Quantidade Anual de VFA Não Aproveitada (kgCQO)	75	107	41	126	173	159	151	170	183

Tabela 4.85 - Resumo das médias global e por tipo de controlo dos parâmetros de avaliação

Parâmetro de Avaliação	Média Global	Média DO	Média pH
Tempo de Acumulação (h)	5,56	5,29	5,78
Nº de Pulsos	11	7	13
Nº de Alterações aos Parâmetros de Controlo	1	0	2
Quantidade de PHA Produzida (g)	253	252	254
% HB	79%	80%	79%
% PHA	65%	65%	65%
Produtividade Volumétrica Média (gPHA/L.h)	0,84	0,90	0,79
Produtividade Específica Média (gPHA/gXA.h)	0,38	0,42	0,36
Quantidade de VFA Adicionada (gCQO)	449	446	451
% VFA Consumida	82%	89%	77%
Capacidade de Produção Anual (kg)	422	455	396
Quantidade Anual de VFA Necessária (kgCQO)	767	791	748
Quantidade Anual de VFA Não Aproveitada (kgCQO)	132	87	167
Rendimento (gCQO PHA/g CQO VFA)	0,79	0,82	0,76

5 Conclusões e Trabalho Futuro

Neste subcapítulo serão apresentadas as principais conclusões retiradas dos ensaios desta dissertação. Simultaneamente serão levantadas propostas para trabalho futuro de forma a otimizar o trabalho realizado.

Neste trabalho testaram-se 2 algoritmos de controlo distintos, ao longo de 7 ensaios à escala laboratorial e 10 ensaios à escala piloto, para um processo de produção de PHA utilizando MMC e VFA como fonte de carbono. Os algoritmos propostos baseavam-se na monitorização em linha de um sinal obtido através de uma sonda, o 1º algoritmo tinha por base o comportamento do pH do meio e o 2º o comportamento do DO.

Em primeiro lugar, concluiu-se que qualquer sistema de controlo da alimentação, dependente da monitorização de um sinal obtido por uma sonda, para funcionar é essencial confirmar que todas as ligações elétricas estão funcionais e que não existem grandes interferências no sinal. Se tal procedimento não for adequadamente assegurado, existirá a hipótese de nenhum algoritmo funcionar pois estes necessitam de *input* fidedigno. Os ensaios à escala laboratorial tiveram como objetivo a avaliação dos algoritmos a nível de programação e o estudo dos parâmetros de controlo utilizados, nomeadamente, o pH_{sp} , o DO_{sp} e o D_{sp} .

Verificou-se, nos ensaios à escala laboratorial que a nível de programação não existiam erros no código, sendo possível efetuar os testes sem que ocorressem problemas. Ainda nos ensaios preliminares observou-se a tendência de aumento do tempo de consumo dos pulsos ao longo das acumulações. Considerando os resultados do 1º algoritmo, concluiu-se que a atribuição do valor do pH_{sp} desempenhava um papel de grande relevância na automação dos ensaios. Respeitante aos resultados do 2º algoritmo, nos ensaios laboratoriais, verificou-se que, para manter a autonomia do processo, seria necessário atribuir um valor de D_{sp} inferior ou igual a 0,01, para garantir que este era atingido. Observou-se, ainda, uma tendência decrescente no valor do declive do DO e uma tendência crescente no DO mínimo atingido por pulso.

Em relação à automação do processo, o 2º algoritmo (controlo da alimentação utilizando o sinal de DO) obteve 100% de eficácia, não sendo necessário alterar parâmetros ao longo dos ensaios. Em relação ao 1º algoritmo observou-se que foi necessário alterar o parâmetro de decisão pH_{sp} 8 vezes nos 5 ensaios efetuados. Assim, ficou explicita a necessidade de melhorar este algoritmo de forma a que funcione automaticamente. Apresentam-se 2 hipóteses para a solução do problema: a primeira será criar um *setpoint* que varie de pulso para pulso, ou seja, autonomamente o programa reduz o valor de pH_{sp} ao longo do tempo. A segunda hipótese está relacionada com a derivada do sinal de pH, onde se esta for igual a zero indicará que o pH parou de subir e que poderá ser o momento de alimentar um novo pulso.

Nos ensaios desta dissertação produziu-se um total de 2,28 kg de PHA e observando os resultados práticos conclui-se que na maioria dos parâmetros estudados o 2º algoritmo obteve resultados melhores, nomeadamente, na quantidade de PHA produzido (279g), na produtividade volumétrica média (1,06 gPHA/L.h), na produtividade específica média (0,45 gPHA/gX_A.h), na % VFA consumida (94%), na capacidade de produção anual (534 kg), na quantidade anual de VFA não aproveitados (41 kgCQO) e no

rendimento PHA/VFA (0,82 gCQO PHA/gCQO VFA), enquanto que os resultados mais positivos obtidos com a utilização do 1º algoritmo foram os seguintes, quantidade de PHA produzido (277g), produtividade volumétrica média (0,96 gPHA/L.h), produtividade específica média (0,41 gPHA/gX_A.h), % VFA consumida (83%), capacidade de produção anual (484 kg), quantidade anual de VFA não aproveitados (151 kgCQO) e o rendimento PHA/VFA (0,76 gCQO PHA/gCQO VFA).

Comparando os resultados obtidos nesta dissertação com alguns valores do levantamento bibliográfico conclui-se que, nos parâmetros estudados, o desempenho do 2º algoritmo se mostrou eficaz para a produção de PHA utilizando MMC e que, apesar de tudo, os resultados obtidos com a utilização do 1º algoritmo também se demonstraram positivos. Em relação às produtividades volumétricas médias observou-se uma média para os ensaios deste trabalho de 0,84 gPHA/L.h, ou seja, 2,5 vezes superior à média dos resultados retirados de trabalhos de outros autores utilizando MMC. Já o valor médio de % PHA de 65% obtido nesta dissertação foi 12% superior à média dos valores retirados do levantamento bibliográfico.

Como propostas de trabalho futuro, para além das hipóteses já apresentadas acerca da alteração do pH_{sp}, começa-se por explicitar a necessidade de se efetuar uma avaliação económica ao processo de forma a ser possível compreender quais os parâmetros críticos no processo de produção de PHA utilizando MMC.

Propõe-se também que sejam estudadas estratégias para estimar o momento ideal para terminar processo de acumulação. Para tal, sugere-se que, numa primeira fase, se desenvolva um algoritmo que em conjunto com um aparelho de medição *online* NIR (*near-infrared spectroscopy*) consiga calcular a %PHA em qualquer momento. Assim, será possível quantificar a redução na produtividade ao longo do tempo e saber quando se deve parar o processo. Uma segunda hipótese para estimar o momento ideal de término está relacionada com o estudo feito aos perfis de pH nos ensaios preliminares desta dissertação. Foram ajustadas funções quadráticas ao perfil do pH entre pulsos e concluiu-se que os parâmetros B e C se comportavam de forma semelhante entre ensaios, e de forma relacionável com a quantidade de PHA por litro de reator. Sugere-se um algoritmo de controlo misto, onde o parâmetro de controlo da alimentação seja obtido através do perfil de DO e o parâmetro de seleção do momento para terminar o processo seja estimado através do perfil de pH.

Para terminar, nesta dissertação foram programados o 3º e 4º algoritmos, como explicado no subcapítulo dos materiais e métodos, mas que, no entanto, não foram aplicados nos ensaios. Ambos os algoritmos apresentam características promissoras relativamente à automação e produtividade do processo, logo sugere-se que sejam testados.

Referências Bibliográficas

1. Pinto, F. "Advances on the production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by mixed microbial cultures from sugar cane molasses" Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa - Tese de Mestrado de 2012.
2. PlasticsEurope. Plastics – the Facts 2017. (2017). doi:10.1016/j.marpolbul.2013.01.015. Data de Consulta: junho 2017
3. Ulrich, R. International Trends in Plastic Packaging and Processing. *GPCA PlastiCon* (2017). Disponível em: <http://www.gpcaplastics.com/wp-content/uploads/2017/04/Ulrich-Reiners.pdf>. Data de Consulta: junho 2017
4. Moretti, P. "Plastics - Global Market Outlook. PM2Consult" (2015). Disponível em: http://www.mypurchasingcenter.com/files/8914/4346/4900/Plastics_-_Global_Market_Outlook.pdf. Data de Consulta: junho 2017
5. Freedonia Group. World Bioplastics (2013). Disponível em: <https://www.freedoniagroup.com/brochure/30xx/3089smwe.pdf>. Data de Consulta: agosto 2017
6. IfBB- Institute for Bioplastics. Biopolymers – facts and statistics 2017. Disponível em: https://www.ifbb-hannover.de/files/IfBB/downloads/faltblaetter_broschueren/Biopolymers-Facts-Statistics_2017.pdf. Data de Consulta: março 2018
7. European Bioplastics. Bioplastics—Facts and Figures. (2017). Disponível em: http://docs.european-bioplastics.org/publications/EUBP_Facts_and_figures.pdf. Data de Consulta: Fevereiro 2018
8. Suchitra, G. "A Review on Strategies for Production of (Poly-3-Hydroxyalkanoates): The Green Materials for Sustainable Development" - Current Status Corresponding Address. *International Journal of Scientific Research and Reviews* : 5, 1–19 (2016).
9. Valentino, F. *et al.* Carbon recovery from wastewater through bioconversion into biodegradable polymers. *N. Biotechnol.* (2016). doi:10.1016/j.nbt.2016.05.007
10. Freedonia. World Bioplastics Study #2823 (2009). Disponível em: http://www.ibbnetzwerk-gmbh.com/fileadmin/Content/StudienAnalysen/Freedonia-World_Bioplastics.pdf Data de Consulta: maio 2017
11. Jiang, G. *et al.* "Carbon sources for polyhydroxyalkanoates and an integrated biorefinery." *Int. J. Mol. Sci.* **17**, (2016).
12. Ycharts. World Crude Oil Production (Actual Value and predictions). (2017). Disponível em: https://ycharts.com/indicators/world_crude_oil_production. Data de Consulta: janeiro 2018

13. OPEC. OPEC: Annual statistical Bulletin 2016. *Opec* 128 (2016). doi:ISSN 0475-0608
14. Alves, F.B.,Gomes,J.S. "O Universo da Indústria Petrolífera - da Pesquisa à Refinação" 3ª edição, Fundação Calouste Gulbenkian Lisboa (2014)
15. Braunegg, G., Lefebvre, G. & Genser, K. F. "Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects." *J. Biotechnol.* **65**, 127–161 (1998).
16. Sigma-Aldrich. Polyhydroxybutyrate - Biopolymer (PHB), film, thickness 0.0025 mm, size 25 × 25 mm, grade research grade | Sigma-Aldrich. (2018). Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/gf09454787?lang=pt®ion=PT> - Consultado em: janeiro 2018
17. Reis, M., Albuquerque, M., Universidade, F. C. T. & Lisboa, N. De. "Mixed Culture Processes for Polyhydroxyalkanoate Production from Agro-Industrial Surplus / Wastes as Feedstocks." *Comprehensive Biotechnology* **6**, (Elsevier B.V., 2011).
18. Choi, J. & Lee, S. Y. "High-Level Production of Poly (3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) by Fed-Batch Culture of Recombinant Escherichia coli." *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 4363–4368 (1999).
19. Sugimoto, T., Tsuge, T., Tanaka, K. & Ishizaki, A. "Control of acetic acid concentration by pH-Stat continuous substrate feeding in heterotrophic culture phase of two-stage cultivation of *Alcaligenes eutrophus* for production of P(3HB) from CO₂, H₂, and O₂ under non-explosive conditions." *Biotechnol. Bioeng.* **62**, 625–631 (1999).
20. Park, S. J. & Lee, S. Y. "Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate- co-3-hydroxyalkanoates) by metabolically engineered Escherichia coli strains." *Appl. Biochem. Biotechnol.* **113–116**, 335–346 (2004).
21. Dammer, L. & Scholz, L. "Market Developments of and Opportunities for biobased products and chemicals." (2013). Data de Consulta: janeiro 2018
22. Verlinden, R. A. J., Hill, D. J., Kenward, M. A., Williams, C. D. & Radecka, I. "Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates." *J. Appl. Microbiol.* **102**, 1437–1449 (2007).
23. Chen, G.-Q. & Jiang, X.-R. "Engineering bacteria for enhanced polyhydroxyalkanoates (PHA) biosynthesis." *Synth. Syst. Biotechnol.* 1–6 (2017). doi:10.1016/j.synbio.2017.09.001
24. Silva, F. R. & Bioquímica, L. "Impact of carbon / nitrogen feeding strategy on polyhydroxyalkanoates production using mixed microbial cultures." Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa - Tese de Mestrado de 2015.
25. Albuquerque, M. G. E., Torres, C. A. V & Reis, M. A. M. "Polyhydroxyalkanoate (PHA) production by a mixed microbial culture using sugar molasses : Effect of the influent substrate concentration on culture selection." *Water Res.* **44**, 3419–3433

- (2010).
26. Haas, R., Jin, B. & Zepf, F. T. "Production of Poly(3-hydroxybutyrate) from Waste Potato Starch." *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**, 253–256 (2008).
 27. Lee, S. C., Lee, S. Y., Chang, H. N., Chang, Y. K. & Woo, S. I. "Production of Poly(3-Hydroxybutyric Acid) by Fed-Batch Culture." *Biotechnology and Bioengineering* **43**, 892–898 (1994).
 28. Atlić, A. *et al.* "Continuous production of poly([R]-3-hydroxybutyrate) by *Cupriavidus necator* in a multistage bioreactor cascade." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **91**, 295–304 (2011).
 29. Kulprecha, S., Boonruangthavorn, A., Meksiriporn, B. & Thongchul, N. "Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*." *J. Biosci. Bioeng.* **107**, 240–245 (2009).
 30. Dias, J. M. L. *et al.* "Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by mixed aerobic cultures: From the substrate to the final product." *Macromol. Biosci.* **6**, 885–906 (2006).
 31. Chen, Z., Huang, L., Wen, Q. & Guo, Z. "Efficient polyhydroxyalkanoate (PHA) accumulation by a new continuous feeding mode in three-stage mixed microbial culture (MMC) PHA production process." *J. Biotechnol.* **209**, 68–75 (2015).
 32. Serafim, L. S., Lemos, P. C., Oliveira, R. & Reis, M. A. M. "Optimization of polyhydroxybutyrate production by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding conditions." *Biotechnol. Bioeng.* **87**, 145–160 (2004).
 33. Third, K. A., Newland, M. & Cord-Ruwisch, R. "The effect of dissolved oxygen on PHB accumulation in activated sludge cultures." *Biotechnol. Bioeng.* **82**, 238–250 (2003).
 34. Dias, J. M. L., Serafim, L. S., Lemos, P. C., Reis, M. A. M. & Oliveira, R. "Mathematical modelling of a mixed culture cultivation process for the production of polyhydroxybutyrate." *Biotechnol. Bioeng.* **92**, 209–222 (2005).
 35. Anjum, A. *et al.* Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. *Int. J. Biol. Macromol.* **89**, 161–174 (2016).
 36. Albuquerque, M. G. E., Eiroa, M., Torres, C., Nunes, B. R. & Reis, M. A. M. Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sugar cane molasses. *J. Biotechnol.* **130**, 411–421 (2007).
 37. Valentino, F., Villano, M., Bertin, L., Beccari, M. & Majone, M. Olive Oil Wastewater as a Renewable Polyhydroxyalkanoates. *Renew. Polym.* (2011).
 38. Serafim, L. S., Lemos, P. C., Albuquerque, M. G. E. & Reis, M. A. M. Strategies for PHA production by mixed cultures and renewable waste materials. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **81**, 615–628 (2008).

39. Dionisi, D., Majone, M., Vallini, G., Di Gregorio, S. & Beccari, M. Effect of the applied organic load rate on biodegradable polymer production by mixed microbial cultures in a sequencing batch reactor. *Biotechnol. Bioeng.* **93**, 76–88 (2006).
40. Johnson, K., Jiang, Y., Kleerebezem, R., Muyzer, G. & Van Loosdrecht, M. C. M. Enrichment of a mixed bacterial culture with a high polyhydroxyalkanoate storage capacity. *Biomacromolecules* **10**, 670–676 (2009).
41. Villano, M., Lampis, S., Valentino, F., Vallini, G., Majone, M., Beccari, M. 4th International Conference on Safety & Environment in Process Industry : CIPSAP4, Florence, Italy.
42. Villano, M. *et al.* Effect of pH on the production of bacterial polyhydroxyalkanoates by mixed cultures enriched under periodic feeding. *Process Biochem.* **45**, 714–723 (2010).
43. Basak, B., Ince, O., Artan, N., Yagci, N. & Ince, B. K. Effect of nitrogen limitation on enrichment of activated sludge for PHA production. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **34**, 1007–1016 (2011).
44. Valentino, F., Beccari, M., Fraraccio, S., Zanaroli, G. & Majone, M. Feed frequency in a Sequencing Batch Reactor strongly affects the production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from volatile fatty acids. *N. Biotechnol.* **31**, 264–275 (2014).
45. Duque, A. F. *et al.* Response of a three-stage process for PHA production by mixed microbial cultures to feedstock shift: Impact on polymer composition. *N. Biotechnol.* **31**, 276–288 (2014).
46. Morgan-Sagastume, F. *et al.* Integrated production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) with municipal wastewater and sludge treatment at pilot scale. *Bioresour. Technol.* **181**, 78–89 (2015).
47. Morgan-Sagastume, F. *et al.* Production of polyhydroxyalkanoates in open, mixed cultures from a waste sludge stream containing high levels of soluble organics, nitrogen and phosphorus. *Water Res.* **44**, 5196–5211 (2010).
48. Valentino, F., Karabegovic, L., Majone, M., Morgan-Sagastume, F. & Werker, A. Polyhydroxyalkanoate (PHA) storage within a mixed-culture biomass with simultaneous growth as a function of accumulation substrate nitrogen and phosphorus levels. *Water Res.* **77**, 49–63 (2015).
49. Beccari, M. *et al.* Exploiting olive oil mill effluents as a renewable resource for production of biodegradable polymers through a combined anaerobic – aerobic process. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **84** 901–908 (2009). doi:10.1002/jctb.2173
50. Bengtsson, S., Werker, A., Christensson, M. & Welander, T. Production of polyhydroxyalkanoates by activated sludge treating a paper mill wastewater. *Bioresource Technology* **99**, 509–516 (2008).

51. Mengmeng, C., Hong, C., Qingliang, Z., Ngai, S. & Jie, R. Bioresource Technology Optimal production of polyhydroxyalkanoates (PHA) in activated sludge fed by volatile fatty acids (VFAs) generated from alkaline excess sludge fermentation. *Bioresour. Technol.* **100**, 1399–1405 (2009).
52. Valentino, F., Riccardi, C., Campanari, S., Pomata, D. & Majone, M. Bioresource Technology Fate of b -hexachlorocyclohexane in the mixed microbial cultures (MMCs) three-stage polyhydroxyalkanoates (PHA) production process from cheese whey. *Bioresour. Technol.* **192**, 304–311 (2015).
53. IfBB- Institute for Bioplastics & Biocomposites, A. Biopolymers facts and statistics 2016. (2017). Disponível em: https://www.bio-pro.de/index.php/download_file/16018/9152/. Data de Consulta: novembro 2017
54. Goormachtigh, L. Faculty of Bioscience Engineering Academic year 2012-2013 Modelling and simulation of heterotrophic PHB production. (2013).
55. Werker, A. Method for Accumulation of Polyhydroxyalkanoates in Biomass with on-line Monitoring for Feed Rate Control and Process Termination. *US 2013/0029388 A1*, (2013).
56. Westerberg, K. Using the Dissolved Oxygen Signal for Automatic Control in Fed-Batch Production of PHA by a Mixed Culture. *University Paper*
57. Real Tech Inc. Chemical Oxygen Demand (COD) - Real Tech Inc. *Real Tech Inc.* 1 (2015). Disponível em: <https://realtechwater.com/parameters/chemical-oxygen-demand/> - Data de Consulta: fevereiro 2018
58. Halvorsen, Hans-Peter. System Identification and Estimation in LabVIEW. University College of Southeast Norway (2016)
59. Clark, C. L. *LabVIEW: Digital Signal Processing and Digital Communications*. (2005). doi:10.1036/0071469664
60. National Instruments Corporation. Curso do Software - versão 6.0, N. I. Manual de treinamento do LabVIEW Básico I. Código do manual: 322682A-01 (2001).
61. Aslan, A.K.H.N., Ali, M. D. M., Morad, N. A. & Tamunaidu, P. Polyhydroxyalkanoates production from waste biomass. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* **36**, 12040 (2016).
62. Fernández-Dacosta, C., Posada, J. A., Kleerebezem, R., Cuellar, M. C. & Ramirez, A. Microbial community-based polyhydroxyalkanoates (PHAs) production from wastewater: Techno-economic analysis and ex-ante environmental assessment. *Bioresour. Technol.* **185**, 368–377 (2015).
63. Leong, Y. K. *et al.* Economic and environmental analysis of PHAs production process. *Clean Technol. Environ. Policy* **19**, 1941–1953 (2017).
64. Choi, J. Il & Lee, S. Y. Process analysis and economic evaluation for poly(3-hydroxybutyrate) production by fermentation. *Bioprocess Eng.* **17**, 335–342 (1997).

